

REGULAMENTOS

REGULAMENTO (UE) 2017/771 DA COMISSÃO

de 3 de maio de 2017

que altera o Regulamento (CE) n.º 152/2009 no que diz respeito aos métodos de determinação dos teores de dioxinas e de bifenilos policlorados

(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 ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 11.º, n.º 4,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão ⁽²⁾ inclui métodos para a determinação dos teores de dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF), bifenilos policlorados (PCB) sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas nos alimentos para animais.
- (2) O laboratório de referência da UE para as dioxinas e os PCB nos alimentos para animais e nos géneros alimentícios apresentou elementos de prova de que, em certos casos, os resultados analíticos respeitantes às dioxinas e aos PCB não são fiáveis quando os laboratórios que efetuam as análises de amostras colhidas pelos operadores das empresas do setor alimentar em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ⁽³⁾ não aplicam os critérios de desempenho previstos na parte B do anexo V do Regulamento (CE) n.º 152/2009. Por conseguinte, é conveniente tornar obrigatória a aplicação dos critérios de desempenho para a análise dessas amostras.
- (3) Uma vez que o método baseado na utilização de um limite de decisão para garantir, com uma certa probabilidade, que um resultado analítico excede o teor máximo, como previsto na Decisão 2002/657/CE da Comissão ⁽⁴⁾, deixou de ser aplicado na análise de dioxinas, furanos e PCB nos alimentos para animais, é conveniente suprimi-lo e manter apenas o método da incerteza expandida utilizando o fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de aproximadamente 95 %.
- (4) Foram elaborados documentos de orientação sobre a incerteza de medição e a estimativa do limite de deteção (LD) e do limite de quantificação (LOQ). É conveniente fazer referência a esses documentos.
- (5) Em consonância com os requisitos de notificação aplicáveis aos métodos de pré-seleção bioanalíticos previstos na parte B do anexo V do Regulamento (CE) n.º 152/2009, é conveniente estabelecer igualmente, no capítulo II da referida parte B, requisitos de notificação específicos para os métodos físico-químicos, a utilizar para efeitos de pré-seleção.
- (6) Dado que, na maioria dos casos, as análises de dioxinas, de PCB sob a forma de dioxina e de PCB não semelhantes a dioxinas são realizadas conjuntamente, é conveniente alinhar os critérios de desempenho para os PCB não semelhantes a dioxinas previstos no anexo V, parte B, capítulo III, ponto 3.3, do Regulamento (CE) n.º 152/2009 com os critérios de desempenho para as dioxinas e os PCB sob a forma de dioxina. Trata-se de uma simplificação sem alterações substanciais na prática, uma vez que no caso dos PCB não semelhantes a dioxinas a intensidade relativa dos iões qualificadores em relação aos iões-alvo é >50 %.

⁽¹⁾ JO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

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

⁽³⁾ Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de janeiro de 2005, que estabelece requisitos de higiene dos alimentos para animais (JO L 35 de 8.2.2005, p. 1).

⁽⁴⁾ 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);

- (7) Na sequência da experiência adquirida, é conveniente adaptar algumas especificações técnicas, tais como as recuperações de padrões marcados com isótopos previstas no anexo V, parte B, capítulo III, pontos 7.3 e 7.5, do Regulamento (CE) n.º 152/2009.
- (8) Foram, além disso, propostas várias outras pequenas alterações às disposições atuais para melhorar a coerência da terminologia utilizada, tornando necessária a substituição de toda a parte B do anexo V do Regulamento (CE) n.º 152/2009, a fim de preservar a legibilidade do texto.
- (9) O Regulamento (CE) n.º 152/2009 deve, por conseguinte, ser alterado em conformidade.
- (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

No anexo V do Regulamento (CE) n.º 152/2009, a parte B é alterada em conformidade com o anexo do presente regulamento.

Artigo 2.º

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

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

Feito em Bruxelas, em 3 de maio de 2017.

Pela Comissão
O Presidente
Jean-Claude JUNCKER

ANEXO

No anexo V do Regulamento (CE) n.º 152/2009, a parte B, «DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) E DE PCB», passa a ter a seguinte redação:

«B. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) E DE PCB

CAPÍTULO I

Métodos de amostragem e interpretação dos resultados analíticos**1. Âmbito de aplicação e definições**

As amostras destinadas ao controlo oficial dos teores de dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF), bifenilos policlorados (PCB) sob a forma de dioxina ⁽¹⁾ e PCB não semelhantes a dioxinas nos alimentos para animais devem ser colhidas em conformidade com os métodos descritos no anexo I. Devem aplicar-se as exigências quantitativas respeitantes ao controlo de substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos, tal como se estabelece no ponto 5.1 do anexo I. As amostras globais assim obtidas são consideradas representativas dos lotes ou sublotos dos quais foram colhidas. A observância dos teores máximos fixados pela Diretiva 2002/32/CE deve ser estabelecida com base nos teores determinados nas amostras de laboratório.

Para efeitos da presente parte B, aplicam-se as definições estabelecidas no anexo I da Decisão 2002/657/CE da Comissão ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Quadro dos FET (fatores de equivalência tóxica) para PCDD, PCDF e PCB sob a forma de dioxina. 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
Dibenzo-p-dioxinas («PCDD») e dibenzo-p-furanos («PCDF»)		PCB «sob a forma de dioxina» PCB não-orto + PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB não-orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
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	PCB mono-orto	
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» = octa; «CDD» = clorodibenzodioxina; «CDF» = clorodibenzofurano; «CB» = clorobifenilo.

⁽²⁾ 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).

Para além destas definições, para efeitos do disposto na presente parte B são aplicáveis as seguintes definições:

«Métodos de pré-seleção»: os métodos utilizados para a seleção de amostras com teores de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina que excedam os teores máximos ou os limiares de intervenção. Devem apresentar uma elevada capacidade de processamento de amostras com uma boa relação custo-eficácia, 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 utilizado para verificar a conformidade com o teor máximo devem ser verificados por uma reanálise completa da amostra inicial utilizando um método de confirmação.

«Métodos de confirmação»: os métodos que fornecem informações completas ou complementares que permitem a identificação e quantificação inequívocas de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina no teor máximo ou, em caso de necessidade, no limiar de intervenção. Estes métodos utilizam a cromatografia gasosa/espectrometria de massa de alta resolução (GC-HRMS) ou a cromatografia gasosa/espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS).

2. Conformidade do lote ou do sublote com o teor máximo

2.1. No que se refere a PCB não semelhantes a dioxinas

O lote ou sublote está conforme com o teor máximo se o resultado analítico para a soma de PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180 (a seguir referidos como PCB não semelhantes a dioxinas) não for superior ao teor máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE, tomando em consideração a incerteza expandida de medição ⁽¹⁾. O lote ou sublote não está conforme com o teor máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE se a média dos dois limites superiores ⁽²⁾ dos resultados analíticos obtidos a partir de uma análise em duplicado ⁽³⁾, tendo em conta a incerteza expandida de medição, for superior ao teor máximo com um grau de confiança elevado, ou seja, utiliza-se, para avaliar a conformidade, a concentração analisada após dedução da incerteza expandida de medição.

A incerteza expandida de medição é calculada utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não está conforme se a média dos valores medidos menos a incerteza expandida da média for superior ao teor máximo.

As regras descritas no presente ponto são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. No caso de análises para efeitos de direito de recurso ou de procedimentos de arbitragem, são aplicáveis as normas nacionais.

2.2. No que se refere a PCDD/F e a PCB sob a forma de dioxina

O lote ou sublote está conforme com o teor máximo se o resultado de uma única análise,

- realizada por um método de pré-seleção com uma taxa de falsos resultados conformes inferior a 5 %, indicar que o teor não excede o respetivo teor máximo de PCDD/F nem da soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina fixados na Diretiva 2002/32/CE,
- realizada por um método de confirmação, não exceder o respetivo teor máximo de PCDD/F nem da soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina fixados na Diretiva 2002/32/CE, tendo em conta a incerteza expandida de medição.

⁽¹⁾ Devem seguir-se, quando aplicáveis, os princípios descritos no *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* (Documento de orientação sobre a incerteza de medição para laboratórios que efetuam análises de PCDD/F e PCB utilizando espectrometria de massa de diluição de isótopos) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽²⁾ O conceito de «limite superior» preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual ao limite de quantificação. O conceito de «limite inferior» preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual a zero. O conceito de «limite médio» preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual a metade do limite de quantificação.

⁽³⁾ Análise em duplicado: uma análise separada dos analitos pertinentes utilizando uma segunda alíquota da mesma amostra homogeneizada. De forma geral, aplicam-se os requisitos relativos à análise em duplicado previstos no anexo II, capítulo C, ponto 3. No entanto, para métodos que utilizem padrões internos marcados com ¹³C para os analitos pertinentes, a análise em duplicado só é necessária se o resultado da primeira determinação não for conforme. A análise em duplicado é necessária para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. No caso de a análise ser realizada no contexto de um incidente de contaminação, a confirmação através de uma análise em duplicado pode 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.

Em relação aos ensaios de pré-seleção, deve ser estabelecido um valor-limite para decidir da conformidade da amostra com os respetivos teores máximos fixados quer para PCDD/F, quer para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina.

O lote ou sublote não está conforme com o teor máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE se a média dos dois limites superiores ⁽¹⁾ dos resultados analíticos obtidos com uma análise em duplicado ⁽²⁾ utilizando um método de confirmação, tendo em conta a incerteza expandida de medição, for superior ao teor máximo com um grau de confiança elevado, ou seja, utiliza-se, para avaliar a conformidade, a concentração analisada, após dedução da incerteza expandida de medição.

A incerteza expandida de medição é calculada utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não está conforme se a média dos valores medidos menos a incerteza expandida da média for superior ao teor máximo.

Para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, deve utilizar-se a soma das incertezas expandidas estimadas dos resultados analíticos obtidos separadamente para PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina.

As regras descritas no presente ponto são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. No caso de análises para efeitos de direito de recurso ou de procedimentos de arbitragem, são aplicáveis as normas nacionais.

3. **Resultados superiores aos limiares de intervenção estabelecidos no Anexo II da Diretiva 2002/32/CE**

Os limiares de intervenção servem de instrumento para a seleção de amostras nos casos em que é necessário identificar uma fonte de contaminação e adotar medidas com vista à sua redução ou eliminação. Os métodos de pré-seleção devem estabelecer os valores-limite adequados para a seleção daquelas amostras. Caso sejam necessários esforços significativos para identificar a fonte e reduzir ou eliminar a contaminação, é adequado confirmar a superação dos limiares de intervenção por uma análise em duplicado mediante um método de confirmação e tendo em conta a incerteza expandida de medição ⁽³⁾.

CAPÍTULO II

Preparação das amostras e requisitos respeitantes aos métodos de análise utilizados no controlo oficial dos teores de dioxinas (PCDD/PCDF) e de PCB sob a forma de dioxina em alimentos para animais

1. **Âmbito de aplicação**

Os requisitos estabelecidos no presente capítulo devem ser aplicados quando se analisam alimentos para animais para efeitos de controlo oficial dos teores de PCDD/F substituídos nas posições 2,3,7 e 8 e de PCB sob a forma de dioxina, bem como no que se refere à preparação das amostras e aos requisitos analíticos para outros fins regulamentares, incluindo os controlos efetuados pelos operadores das empresas do setor dos alimentos para animais para assegurar a conformidade com o disposto no Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ O conceito de «limite superior» preconiza que o contributo para os equivalentes de toxicidade (TEQ) de cada congénere não quantificado seja igual ao limite de quantificação. O conceito de «limite inferior» preconiza que o contributo para os TEQ de cada congénere não quantificado seja igual a zero. O conceito de «limite médio» preconiza que o contributo para os TEQ de cada congénere não quantificado seja igual a metade do limite de quantificação.

⁽²⁾ De forma geral, aplicam-se os requisitos relativos à análise em duplicado previstos no anexo II, capítulo C, ponto 2. No entanto, para métodos de confirmação que utilizem padrões internos marcados com ¹³C para os analitos pertinentes, a análise em duplicado só é necessária se o resultado da primeira determinação não for conforme. A análise em duplicado é necessária para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. No caso de a análise ser realizada no contexto de um incidente de contaminação, a confirmação através de uma análise em duplicado pode 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.

⁽³⁾ A explicação e os requisitos para as análises em duplicado para efeitos de controlo dos limiares de intervenção são idênticos aos referidos na nota de rodapé 2 para os teores máximos.

⁽⁴⁾ Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de janeiro de 2005, que estabelece requisitos de higiene dos alimentos para animais (JO L 35 de 8.2.2005, p. 1).

A monitorização da presença de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina nos alimentos para animais 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 limiares de intervenção. Os métodos de pré-seleção devem assegurar uma elevada capacidade de processamento de amostras com uma boa relação custo-eficácia, 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 do tipo sim/não sobre a eventual superação do teor máximo ou do limiar de intervenção. 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 ou 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 de pré-seleção bioanalíticos, o resultado é expresso em equivalentes bioanalíticos (BEQ), ao passo que, em caso de aplicação de métodos físico-químicos GC-MS, o resultado é expresso em equivalentes de toxicidade (TEQ). Os resultados dos métodos de pré-seleção indicados numericamente são adequados para demonstrar a conformidade ou a suspeita de não conformidade ou a superação dos limiares de intervenção e fornecem uma indicação da gama de valores em caso de aplicação subsequente de métodos de confirmação. Não são adequados para fins como a avaliação dos níveis de base, a estimativa de ingestão, o acompanhamento das tendências temporais dos teores ou a reavaliação dos limiares de intervenção e dos teores máximos.

b) *Métodos de confirmação*

Os métodos de confirmação permitem a identificação e quantificação inequívocas de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina presentes numa amostra e fornecem uma informação exaustiva sobre os teores dos diferentes congêneres. Por conseguinte, estes métodos permitem o controlo dos teores máximos e dos limiares de intervenção, incluindo a confirmação dos resultados obtidos por métodos de pré-seleção. Além disso, os resultados podem ser utilizados para outros fins, como a determinação de níveis de base reduzidos na monitorização dos alimentos para animais, o acompanhamento das tendências temporais, a avaliação da exposição e a criação de uma base de dados para uma eventual reavaliação dos limiares de intervenção e dos teores máximos. São também importantes para o estabelecimento de padrões de congêneres 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, pode também utilizar-se a GC-MS/MS.

2. Contexto

Para o cálculo de concentrações de TEQ, as concentrações de cada substância numa determinada amostra devem ser multiplicadas pelos respetivos fatores de equivalência tóxica (FET) (ver nota de rodapé 1 do capítulo I), sendo subsequentemente somadas para darem a concentração total de compostos sob a forma de dioxina expressa em TEQ.

Para efeitos da presente parte B, por limite de quantificação específico aceite de um congénere individual, entende-se 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, na sua forma revista.

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 níveis diferentes a ser monitorizada com um rácio S/R (sinal/ruído) de 3:1 para o sinal de dados em bruto menos intensivo; ou

- b) se, por motivos de ordem técnica, o cálculo sinal/ruído não fornecer resultados fiáveis, o ponto de concentração mais baixo numa curva de calibração que apresente um desvio aceitável ($\leq 30\%$) e coerente (medido pelo menos no início e no final de uma série de amostras analíticas) em relação ao fator de resposta relativo médio calculado para todos os pontos da curva de calibração em cada série de amostras. 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.

Os métodos de pré-seleção bioanalíticos não darão resultados ao nível dos congéneres, mas apenas uma indicação ⁽¹⁾ do valor TEQ, expresso em BEQ para ter em conta o facto de que nem todos os compostos presentes num extrato de amostra que produz uma resposta no teste podem cumprir todos os requisitos do princípio de TEQ.

Os métodos de pré-seleção e de confirmação apenas podem ser aplicados para o controlo de uma determinada matriz se forem suficientemente sensíveis para detetar fiavelmente os teores no limiar de intervenção ou no teor máximo.

3. Requisitos de garantia da qualidade

- 3.1. Devem ser tomadas medidas para evitar a contaminação cruzada em cada etapa do procedimento de amostragem e de análise.
- 3.2. As amostras devem ser conservadas e transportadas em recipientes de vidro, alumínio, polipropileno ou polietileno, adequados para o armazenamento sem qualquer influência nos teores 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.
- 3.3. O armazenamento e o transporte das amostras devem ser realizados de modo a manter a integridade da amostra de alimentos para animais.
- 3.4. Desde que relevante, cada amostra de laboratório deve ser finamente triturada e cuidadosamente misturada, mediante um processo que tenha demonstrado alcançar uma homogeneização completa (por exemplo, trituração que permita passar por um crivo de 1 mm). As amostras devem ser exsiccadas antes da trituração, caso o teor em humidade seja demasiado elevado.
- 3.5. Deve proceder-se ao controlo dos reagentes, do material de vidro e do equipamento relativamente a uma eventual influência nos resultados baseados em TEQ ou em BEQ.
- 3.6. Deve ser efetuada uma análise em branco através da realização de todo o procedimento analítico, omitindo apenas a amostra.
- 3.7. Relativamente aos métodos bioanalíticos, devem testar-se todo o material de vidro e os solventes utilizados na análise para verificar se estão isentos de compostos que interfiram com a deteção de compostos-alvo na gama de trabalho. O material de vidro deve ser enxaguado com solventes ou aquecido a temperaturas adequadas para remover da sua superfície vestígios de PCDD/F, de compostos sob a forma de dioxina e de compostos interferentes.
- 3.8. A quantidade da 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 do limiar de intervenção.
- 3.9. Os procedimentos específicos de preparação de amostras utilizados para os produtos em causa devem seguir orientações aceites internacionalmente.

4. Requisitos aplicáveis aos laboratórios

- 4.1. 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. Devem seguir-se, quando aplicáveis, os princípios descritos nas orientações técnicas relativas à estimativa da incerteza de medição e dos limites de quantificação para a análise de PCDD/F e PCB ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Os métodos bioanalíticos não são específicos para os congéneres incluídos no sistema de FET. Podem estar presentes no extrato de amostra outros compostos estruturalmente relacionados ativos como AhR (receptor 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.

⁽²⁾ Documento de orientação sobre a incerteza de medição para laboratórios que efetuam análises de PCDD/F e PCB utilizando espectrometria de massa de diluição de isótopos (*Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry*) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), Documento de orientação sobre a estimativa de LOD e LOQ para medições no domínio dos contaminantes nos géneros alimentícios e alimentos para animais (*Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

- 4.2. A competência de um laboratório deve ser 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 de alimentos para animais e gamas de concentrações relevantes.
- 4.3. 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 de 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 dos congéneres de PCB, o limite de quantificação na gama dos nanogramas (10^{-9} g) já é suficiente. Quanto à 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). Para todos os restantes congéneres de PCB, é suficiente um limite de quantificação na gama dos nanogramas (10^{-9} g).

5.2. *Seletividade (especificidade) elevada*

5.2.1. É necessário estabelecer uma distinção entre PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e inúmeros outros compostos coextraídos e eventualmente interferentes, que estão presentes em concentrações superiores em várias ordens de grandeza às dos analitos requeridos. Nos métodos de 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.

5.2.2. 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 à remoção de compostos conducentes a falsos resultados não conformes ou compostos que possam diminuir a resposta, provocando falsos resultados conformes.

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

5.3.1. Para os métodos GC-MS, a determinação deve fornecer uma estimativa válida da verdadeira concentração numa amostra. É necessária uma exatidão elevada para se evitar a rejeição do resultado da análise de uma amostra devido à 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).

5.3.2. Para métodos bioanalíticos, deve ser determinada a recuperação aparente do bioensaio. Por recuperação aparente do bioensaio, entende-se o valor BEQ calculado a partir da curva de calibração de TCDD ou do PCB 126 corrigido 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/F e de compostos sob a forma de dioxina durante as fases de extração e de limpeza, compostos coextraídos que aumentam ou diminuem a resposta (efeitos agonistas e antagonistas), a qualidade do ajustamento da curva, ou diferenças entre os valores FET e os valores da potência relativa (REP). A recuperação aparente do bioensaio é calculada a partir de amostras de referência apropriadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor requerido.

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

5.4.1. Os laboratórios devem demonstrar o desempenho de um método na gama do teor máximo (por exemplo, 0,5 vezes, uma vez e duas vezes o teor máximo) com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas, durante o procedimento de validação e durante a análise de rotina.

- 5.4.2. Devem realizar-se controlos regulares com ensaios em branco e com amostras enriquecidas ou análises de amostras de controlo (de preferência, se disponível, material de referência certificado) como medidas internas de controlo da qualidade. Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo da qualidade 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

- 5.5.1. No que diz respeito ao método bioanalítico de pré-seleção, o estabelecimento do limite de quantificação (LOQ) não é um requisito indispensável, mas deve provar-se que o método consegue fazer a diferenciação de todos os valores situados entre o valor do ensaio em branco e o valor-limite. Quando se transmite um valor BEQ, deve ser estabelecido um nível de notificação para lidar com 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 de amostras que contenham os compostos-alvo próximo do teor mínimo exigido, e não a partir de um rácio S/R ou de um ensaio em branco.

- 5.5.2. O LOQ de um método de confirmação deve ser de cerca de um quinto do teor máximo.

5.6. Critérios analíticos

Para se obterem resultados fiáveis de métodos de confirmação ou de pré-seleção, devem ser satisfeitos os seguintes critérios na gama do teor máximo para o valor TEQ ou o valor BEQ, respetivamente, quer determinado como valor TEQ total ou valor BEQ total (como a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina) quer 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 _r)	< 20 %	
Precisão intermédia (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) No que diz respeito aos teores máximos

5.7. Requisitos específicos para métodos de pré-seleção

- 5.7.1. Na pré-seleção podem ser utilizados tanto GC-MS como métodos bioanalíticos. Em relação aos métodos GC-MS, devem respeitar-se os requisitos descritos no ponto 6. Para os métodos bioanalíticos baseados em células, os requisitos específicos estão descritos no ponto 7.
- 5.7.2. 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.
- 5.7.3. 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.

5.7.4. 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 limiar de intervenção, a fim de verificar se a resposta é eventualmente suprimida por substâncias interferentes presentes no extrato da amostra. A concentração medida da amostra enriquecida deve ser comparada com a soma da concentração do extrato não enriquecido mais a concentração do enriquecimento. Se esta concentração medida for inferior, em mais de 25 %, à concentração (soma) calculada, tal é uma indicação de uma potencial supressão do sinal e a respetiva amostra deve ser submetida a análise de confirmação por GC-HRMS. Os resultados devem ser monitorizados através de gráficos de controlo de qualidade.

5.7.5. Controlo da qualidade de amostras conformes:

Aproximadamente 2 % a 10 % das amostras conformes, dependendo da matriz da amostra e da experiência adquirida no laboratório, devem ser confirmadas por GC/HRMS.

5.7.6. Determinação das taxas de falsos resultados conformes a partir de dados de controlo da qualidade:

Deve determinar-se a taxa de falsos resultados conformes obtidos na pré-seleção de amostras abaixo e acima do teor máximo ou do limiar de intervenção. As taxas reais de falsos resultados conformes devem ser inferiores a 5 %. Quando o controlo da qualidade de amostras conformes revelar, 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 vezes o teor máximo (TM), podem também ser incluídos no mínimo de 20 resultados para a avaliação da taxa de falsos resultados conformes. As amostras devem abranger os padrões de congêneres 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 limiar de intervenção, 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.

5.7.7. As amostras potencialmente não conformes na pré-seleção devem ser sempre verificadas por uma reanálise completa da amostra inicial por um método de análise de confirmação. Estas amostras podem também servir para avaliar a taxa de falsos resultados não conformes. Relativamente aos métodos de pré-seleção, a taxa de falsos resultados não conformes é a fração dos resultados que foram confirmados como conformes por análises de confirmação, quando na pré-seleção anterior a amostra tinha sido declarada potencialmente não conforme. A avaliação das vantagens 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.

5.7.8. Nas condições de validação, os métodos bioanalíticos devem fornecer uma indicação válida do valor TEQ, calculado e expresso em BEQ.

Também em relação aos métodos bioanalíticos levados a cabo em condições de repetibilidade, a RSD_r intralaboratorial é tipicamente mais baixa do que em condições de reprodutibilidade (RSD_R).

6. **Requisitos específicos aplicáveis aos métodos GC-MS a respeitar para efeitos de pré-seleção ou de confirmação**

6.1. *Diferenças aceitáveis entre o limite superior e o limite inferior dos resultados TEQ-OMS*

A diferença entre o limite superior e o limite inferior não deve exceder 20 % no caso de confirmação da superação do teor máximo ou, em caso de necessidade, dos limiares de intervenção.

6.2. *Controlo das recuperações*

- 6.2.1. 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}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}C , por forma a validar o procedimento analítico. Deve ser adicionado, pelo menos, um congénere para cada grupo homólogo de PCDD/F tetra a octa-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 espetrometria 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}C e a totalidade dos 12 padrões internos de PCB sob a forma de dioxina marcados com ^{13}C .
- 6.2.2. Também devem ser determinados fatores de resposta relativos no caso dos congéneres para os quais não se adiciona um composto análogo marcado com ^{13}C , através da utilização de soluções de calibração adequadas.
- 6.2.3. Em relação aos alimentos para animais de origem vegetal e aos alimentos para animais de origem animal que contenham menos de 10 % de gorduras, a adição de padrões internos é obrigatória antes da extração. Em relação aos alimentos para animais de origem animal que contenham mais de 10 % de gorduras, os padrões internos são adicionados antes ou após a extração de gorduras. Deve ser efetuada uma validação adequada da eficiência da extração, dependendo da fase em que são introduzidos os padrões internos.
- 6.2.4. Antes da análise por GC-MS, devem ser adicionados 1 ou 2 padrões de recuperação (substitutos).
- 6.2.5. É necessário efetuar o controlo da recuperação. Para os métodos de confirmação, as recuperações de cada padrão interno devem situar-se no intervalo de 60 % a 120 %. São aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais, nomeadamente para algumas dibenzo-p-dioxinas e alguns dibenzofuranos hepta- e octa-clorados, desde que o seu contributo 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-seleção GC-MS, as recuperações devem situar-se no intervalo de 30 % a 140 %.

6.3. *Remoção de substâncias interferentes*

- Os PCDD/F devem ser separados dos compostos clorados interferentes, tais como PCB não semelhantes a dioxina e éteres difenílicos clorados, através de técnicas cromatográficas adequadas (de preferência, com uma coluna de florisil, alumina e/ou carbono).
- A separação de isómeros por cromatografia gasosa deve ser < 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 do teor máximo ou dos limiares de intervenção.

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 todo o intervalo mássico 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, na sua forma revista.

— 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 ± 15 % para uma seleção de iões-produto de transição em comparação com os 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 a um nível igual ou superior à resolução da unidade de massa (resolução da unidade de massa: resolução suficiente para separar dois picos com uma diferença de uma unidade de massa), a fim de reduzir ao mínimo as interferências possíveis sobre os analitos a analisar.

Cumprimento de outros critérios 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, na sua forma revista, 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-seleção, 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 ponto 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 dois terços do limite 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 limiares de intervenção, uma percentagem adequada do respetivo limiar de intervenção servirá como valor-limite.

Se um teor indicativo for expresso em BEQ, os resultados da amostra devem ser apresentados na gama de trabalho e devem exceder o limite de notificação (ver pontos 7.1.1 e 7.1.6).

7.1. Avaliação da resposta do teste

7.1.1. Requisitos gerais

— Ao calcular as concentrações a partir de uma curva de calibração de TCDD, os valores na extremidade superior da curva apresentarão uma grande variação [coeficiente de variação (CV) elevado]. A gama de trabalho é a zona em que este CV é inferior a 15 %. A extremidade inferior da gama de trabalho (limite de notificação) deve ser estabelecida em, pelo menos, três vezes o valor dos ensaios em branco do procedimento. A extremidade superior da gama de trabalho é geralmente representada pelo valor EC₇₀ (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 (ver ponto 7.3) devem situar-se dentro da gama de trabalho.

— As soluções-padrão e os extratos de amostras devem ser testados em triplicado ou, pelo menos, em duplicado. No caso de utilização de duplicados, uma solução-padrão ou um extrato-testemunha testado em quatro a seis cavidades repartidas ao longo da placa deve produzir uma resposta ou concentração (apenas possível na gama de trabalho) com base num CV < 15 %.

7.1.2. Calibração

7.1.2.1. Calibração com curva padrão

- Podem estimar-se os teores das amostras comparando a resposta do teste com uma curva de calibração de TCDD (ou do PCB 126 ou de uma mistura-padrão de PCDD/PCDF/PCB sob a forma de dioxina) para calcular o valor BEQ no extrato e, posteriormente, na amostra.
- As curvas de calibração devem conter oito a 12 concentrações (pelo menos em duplicado), com concentrações suficientes na parte inferior da curva (gama de trabalho). Será dada especial atenção à qualidade do ajustamento da curva na gama de trabalho. Como tal, o valor R^2 tem pouco ou nenhum valor para estimar a adequação do ajustamento numa regressão não linear. Um melhor ajustamento será alcançado através da minimização 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 ou solvente (para ter em conta as impurezas provenientes de solventes e produtos químicos utilizados) e da recuperação aparente (calculada a partir do valor BEQ de amostras de referência adequadas com padrões de congêneres representativos próximos do teor máximo ou do limiar de intervenção). Para a correção da recuperação, a recuperação aparente deve situar-se dentro 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 7.2.4): podem usar-se um ensaio em branco da matriz e três amostras de referência com 0,5 vezes, uma vez e duas vezes o teor máximo ou o limiar de intervenção, eliminando a necessidade de correção em função do ensaio em branco e da recuperação se as propriedades da matriz das amostras de referência corresponderem às das amostras com teor desconhecido. Neste caso, a resposta do teste correspondente a dois terços do teor máximo (ver ponto 7.3) pode ser calculada diretamente a partir destas amostras e servir de valor-limite. Para a verificação de amostras que excedam os limiares de intervenção, o valor-limite poderá ser uma percentagem adequada destes limiares de intervenção.

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 dos 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 congêneres representativos próximos do teor máximo ou do limiar de intervenção e expressa em percentagem do valor BEQ em comparação com o valor TEQ. Em função do tipo de ensaio e dos FET utilizados ⁽¹⁾, 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 a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina refletem estas gamas e devem situar-se entre 30 % e 130 %. Qualquer implicação que a revisão substancial dos valores FET tenha para a legislação da União relativa aos PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina exige a revisão destas gamas.

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

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

A perda de compostos durante a limpeza deve ser verificada durante a validação. Uma amostra em branco enriquecida com uma mistura dos diferentes congéneres deve ser submetida a limpeza (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. O limite de notificação deve ser estabelecido em, pelo menos, três vezes o valor dos ensaios em branco do procedimento.

7.2. Utilização de amostras de referência

7.2.1. As amostras de referência devem representar 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 limiar de intervenção.

7.2.2. Cada série de testes deve comportar um ensaio em branco da matriz e, caso tal não seja possível, um ensaio em branco do procedimento, bem como uma amostra de referência com o teor máximo ou o limiar de intervenção. 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, assegurando assim a adequação do teste. Essas amostras podem ser utilizadas para as correções em função do ensaio em branco e da recuperação.

7.2.3. 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 dos congéneres não podem conduzir a uma subestimação dos teores.

7.2.4. Podem incluir-se amostras de referência suplementares com, por exemplo, teores 0,5 vezes e duas vezes superiores ao teor máximo ou ao limiar de intervenção, para demonstrar o desempenho correto do teste dentro da gama requerida para o controlo do teor máximo ou do limiar de intervenção. Combinadas, estas amostras podem ser utilizadas para calcular os valores BEQ das amostras de ensaio (ver ponto 7.1.2.2).

7.3. Determinação de valores-limite

A relação entre os resultados bioanalíticos em BEQ e os resultados do método 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, 0,5 vezes, uma vez e duas vezes o TM, com seis repetições em cada teor ($n = 24$). Os fatores de correção (do ensaio em branco e da recuperação) podem ser estimados a partir desta relação, mas devem ser verificados em conformidade com o ponto 7.2.2.

Devem ser estabelecidos valores-limite para decidir da conformidade da amostra com os teores máximos ou para verificar se os limiares de intervenção, se relevantes, estão conformes aos respetivos teores máximos ou limiares de intervenção 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 $RSD_R < 25$ %. O limite de decisão do método de confirmação é o teor máximo, tendo em conta a incerteza expandida de medição.

O valor-limite (em BEQ) pode ser calculado em conformidade com uma das abordagens mencionadas nos pontos 7.3.1, 7.3.2 e 7.3.3. (ver figura 1).

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

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

em que:

BEQ_{DL} BEQ correspondente ao limite de decisão do método de confirmação, trata-se do teor máximo, tendo em conta a incerteza expandida 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 , determinada por um método de confirmação

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

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ parâmetro do quadrado da soma, } i = \text{índice do ponto de calibração } i$$

- 7.3.2. Cálculo a partir dos resultados bioanalíticos (corrigidos em função do ensaio em branco e da recuperação) de múltiplas análises de amostras ($n \geq 6$), 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:

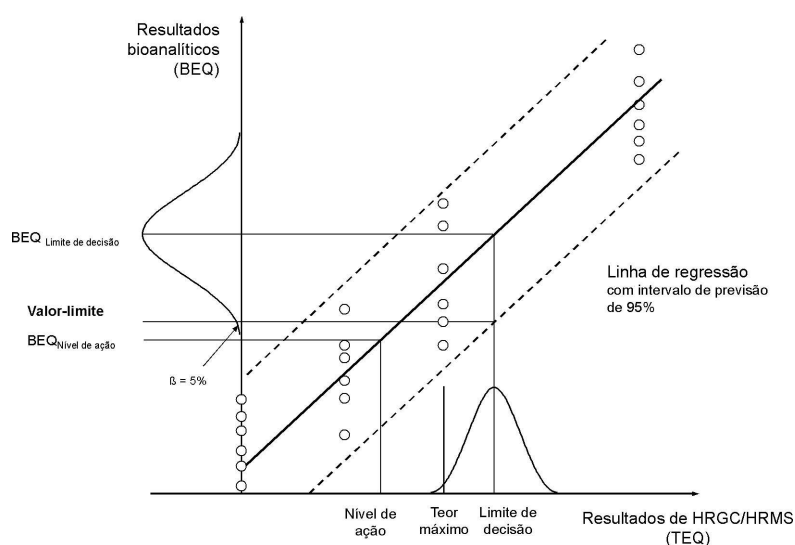
SD_R desvio-padrão dos resultados do bioensaio no BEQ_{DL} , medidos em condições de reprodutibilidade intralaboratorial

- 7.3.3. Cálculo como 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 dois terços do teor máximo ou do limiar de intervenção, com base na observação de que este teor estará próximo do valor-limite determinado em conformidade com o ponto 7.3.1 ou com o ponto 7.3.2:

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

- 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 ($n \geq 6$) contaminadas no limite de decisão do método de confirmação, como a extremidade *inferior* da distribuição dos dados (representado na figura por uma curva em forma de sino) no valor BEQ médio correspondente.

Figura 1



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 diferentes padrões de matrizes/congéneres, podem ser superiores aos teores máximos ou aos limiares de intervenção 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 congéneres. 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 limiar de intervenção.

7.4. Características de desempenho

- 7.4.1. Uma vez que não se podem utilizar padrões internos nos métodos bioanalíticos, devem ser realizados testes de repetibilidade de métodos bioanalíticos 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.
- 7.4.2. 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).
- 7.4.3. Devem ser definidos os compostos-alvo, as possíveis interferências e os teores máximos toleráveis para a amostra em branco.
- 7.4.4. 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 pode ser superior a 15 %.
- 7.4.5. Os resultados não corrigidos das amostras de referência expressos em BEQ (no ensaio em branco e no teor máximo ou limiar de intervenção) devem ser utilizados para a avaliação do desempenho do método bioanalítico durante um período de tempo constante.
- 7.4.6. Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo da qualidade para os 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 controlados de modo a evitar falsos resultados conformes quando subtraídos.

- 7.4.7. 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.
- 7.4.8. 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, duas vezes o teor máximo, 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.
- 7.4.9. 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

8.1. Métodos de confirmação

- 8.1.1. Os resultados analíticos devem conter os teores de cada congénere de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e os valores TEQ devem ser 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.
- 8.1.2. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.
- 8.1.3. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 6.2.5, se o teor máximo for excedido (neste caso, as recuperações para uma das duas análises em duplicado) e noutros casos mediante pedido.
- 8.1.4. Como a incerteza expandida de medição deve ser tida em conta ao decidir da conformidade de uma amostra, este parâmetro deve 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 deve ser utilizada para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.
- 8.1.5. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.

8.2. Métodos bioanalíticos de pré-seleção

- 8.2.1. O resultado da pré-seleção deve ser expresso como «conforme» ou «suspeito de ser não conforme» («suspeito»).
- 8.2.2. Além disso, pode ser dado um resultado indicativo de PCDD/F e/ou de PCB sob a forma de dioxina expresso em BEQ, e não TEQ.
- 8.2.3. As amostras com uma resposta inferior ao limite de notificação devem ser indicadas como «inferiores ao limite de notificação». As amostras com uma resposta acima da gama de trabalho devem ser indicadas como «excedendo a gama de trabalho» e o teor correspondente à extremidade superior da gama de trabalho deve ser dado em BEQ.
- 8.2.4. Para cada tipo de matriz da amostra, o relatório deve mencionar o teor máximo ou o limiar de intervenção em que se baseia a avaliação.
- 8.2.5. O relatório deve mencionar o tipo de teste aplicado, o princípio de base do teste e o tipo de calibração.

- 8.2.6. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.
- 8.2.7. 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.
- 8.2.8. Os resultados não conformes só devem ser notificados a partir de análises de confirmação.
- 8.3. *Métodos físico-químicos de pré-seleção*
- 8.3.1. O resultado da pré-seleção deve ser expresso como «conforme» ou «suspeito de ser não conforme» («suspeito»).
- 8.3.2. Para cada tipo de matriz da amostra, o relatório deve mencionar o teor máximo ou o limiar de intervenção em que se baseia a avaliação.
- 8.3.3. Além disso, podem ser indicados os teores de cada congénere de PCDD/F e/ou PCB sob a forma de dioxina e os valores TEQ notificados em termos de limite inferior, limite superior e limite médio. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.
- 8.3.4. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 6.2.5, se o teor máximo for excedido (neste caso, as recuperações para uma das duas análises em duplicado) e noutros casos mediante pedido.
- 8.3.5. O relatório deve mencionar o método GC-MS aplicado.
- 8.3.6. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.
- 8.3.7. 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.
- 8.3.8. Só se pode decidir que existe incumprimento após a realização de análises de confirmação.

CAPÍTULO III

Preparação das amostras e requisitos respeitantes aos métodos de análise utilizados no controlo oficial dos teores de PCB não semelhantes a dioxinas em alimentos para animais

1. Âmbito de aplicação

Os requisitos expostos no presente capítulo devem ser aplicados quando se analisam alimentos para animais para efeitos de controlo oficial dos teores de PCB não semelhantes a dioxinas, bem como no que se refere à preparação das amostras e aos requisitos analíticos para outros fins regulamentares, incluindo os controlos efetuados pelos operadores das empresas do setor dos alimentos para animais para assegurar a conformidade com o disposto no Regulamento (CE) n.º 183/2005.

2. Métodos de deteção aplicáveis

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

3. Identificação e confirmação dos analitos requeridos

- 3.1. Tempo de retenção relativo em relação a padrões internos ou padrões de referência (desvio aceitável de $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Separação, por cromatografia gasosa, dos PCB não semelhantes a dioxinas das substâncias interferentes, especialmente PCB coeluídos, em especial se os teores das amostras se situarem na gama dos limites legais e for necessário confirmar a não conformidade ⁽¹⁾.
- 3.3. Requisitos aplicáveis a técnicas GC-MS

Verificação de, pelo menos, o seguinte número de iões moleculares ou de iões característicos do grupo dentro da molécula:

- a) dois iões específicos, para a HRMS;
- b) três iões específicos, para a LRMS;
- c) dois iões precursores específicos, cada um com um ião-produto de transição correspondente, para a MS-MS.

Tolerâncias máximas permitidas para os rácios de abundância de 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 para o ião-alvo (ião mais abundante controlado) e os iões qualificadores: ± 15 %

3.4. Requisitos para técnicas de GC-ECD

Devem confirmar-se os resultados que excedem o teor máximo por meio de duas colunas de GC com fases estacionárias de polaridade diferente.

4. Demonstração do desempenho do método

Deve validar-se o desempenho do método na gama do teor máximo (0,5 a duas vezes o teor máximo) com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas (ver requisitos aplicáveis à precisão intermédia mencionados no ponto 9).

5. Limite de quantificação

A soma dos LOQ ⁽²⁾ dos PCB não semelhantes a dioxinas não pode ser superior a um terço do teor máximo ⁽³⁾.

6. 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.

7. Controlo das recuperações

- 7.1. Devem utilizar-se padrões internos adequados, com propriedades físico-químicas comparáveis às dos analitos requeridos.

⁽¹⁾ Os congéneres que coeluem frequentemente são, por exemplo, os PCB 28/31, PCB 52/69 e 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.

⁽²⁾ Quando aplicável, devem seguir-se os princípios descritos no «Documento de orientação sobre a estimativa de LOD e LOQ para medições no domínio dos contaminantes nos géneros alimentícios e alimentos para animais» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽³⁾ 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.

7.2. Adição de padrões internos:

Adição a produtos (antes do processo de extração e limpeza).

7.3. Requisitos para os métodos que utilizem os seis congéneres de PCB não semelhantes a dioxinas marcados com isótopos:

- a) os resultados devem ser corrigidos em função das recuperações de padrões internos;
- b) as recuperações de padrões internos marcados com isótopos devem situar-se entre 60 % e 120 %;
- c) são aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais cujo contributo para a soma dos PCB não semelhantes a dioxinas seja inferior a 10 %.

7.4. Requisitos para os métodos que não utilizem os seis padrões internos marcados com isótopos ou que utilizem outros padrões internos:

- a) a recuperação de padrões internos deve ser controlada para cada amostra;
- b) as recuperações de padrões internos devem situar-se entre 60 % e 120 %;
- c) os resultados devem ser corrigidos em função das recuperações de padrões internos.

7.5. 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. Consideram-se aceitáveis as recuperações destes congéneres se se situarem entre 60 % e 120 %.

8. **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. Além disso, devem seguir-se, quando aplicáveis, os princípios descritos nas orientações técnicas relativas à estimativa da incerteza de medição e dos limites de quantificação para a análise de PCB ⁽¹⁾.

9. **Características de desempenho: critérios aplicáveis à soma dos PCB não semelhantes a dioxinas no teor máximo**

	Espectrometria de massa de diluição de isótopos ⁽¹⁾	Outras técnicas
Rigor	– 20 a + 20 %	– 30 a + 30 %
Precisão intermédia (RSD%)	≤ 15 %	≤ 20 %
Diferença do cálculo entre o limite superior e o limite inferior	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Devem ser utilizados como padrões internos os seis compostos análogos marcados com ¹³C

10. **Notificação dos resultados**

10.1. Os resultados analíticos devem conter os teores de cada congénere de PCB não semelhantes a dioxinas e da soma desses congéneres de PCB, 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.

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

- 10.2. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCB.
 - 10.3. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 7, se o teor máximo for excedido e noutros casos mediante pedido.
 - 10.4. Como a incerteza expandida de 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 %.
 - 10.5. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.»
-