

REGULAMENTO (UE) N.º 519/2014 DA COMISSÃO**de 16 de maio de 2014****que altera o Regulamento (CE) n.º 401/2006 no que se refere aos métodos de amostragem de lotes grandes, especiarias e suplementos alimentares, aos critérios de desempenho para as toxinas T-2 e HT-2 e a citrinina e aos métodos de análise de rastreio****(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 1881/2006 da Comissão ⁽²⁾ fixa os teores máximos de certas micotoxinas presentes em determinados géneros alimentícios.
- (2) A amostragem desempenha um papel fundamental na determinação exata do teor de micotoxinas, que se apresentam distribuídas de forma muito heterogénea num lote. Afigura-se, pois, necessário estabelecer critérios gerais que os métodos de amostragem devem respeitar.
- (3) O Regulamento (CE) n.º 401/2006 da Comissão ⁽³⁾ fixa os critérios de amostragem para efeitos de controlo dos teores de micotoxinas.
- (4) É necessário alterar as regras relativas à amostragem para as especiarias, a fim de ter em conta as diferenças de dimensão das partículas, o que leva à distribuição heterogénea da contaminação com micotoxinas pelas especiarias. Além disso, é apropriado estabelecer regras para a amostragem de lotes grandes, a fim de assegurar uma aplicação uniforme em toda a União. É também conveniente esclarecer que método de amostragem tem de ser aplicado à amostragem do sumo de maçã.
- (5) Os critérios de desempenho para as toxinas T-2 e HT-2 têm de ser atualizados, a fim de ter em conta o progresso científico e tecnológico. Os critérios de desempenho para a citrinina devem ser estabelecidos tendo em conta o limite máximo fixado para citrinina em suplementos alimentares à base de arroz fermentado com levedura vermelha *Monascus purpureus*.
- (6) Para a realização de análises de micotoxinas, as metodologias de rastreio são cada vez mais utilizadas. É adequado estabelecer critérios que os métodos de despistagem têm de cumprir para fins regulamentares.
- (7) 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

O Regulamento (CE) n.º 401/2006 é alterado do seguinte modo:

1) O anexo I é alterado do seguinte modo:

a) Na parte B, a nota de rodapé n.º 1 passa a ter a seguinte redação:

«(1) A amostragem de lotes deste tipo deve ser efetuada em conformidade com as normas previstas na parte L. As orientações para a amostragem de grandes lotes devem constar de um documento de orientação, disponível no seguinte sítio *web*: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>

⁽¹⁾ JO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ 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);

⁽³⁾ Regulamento (CE) n.º 401/2006 da Comissão, de 23 de fevereiro de 2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios (JO L 70 de 9.3.2006, p. 12).

A aplicação de normas de amostragem em conformidade com a norma EN ISO 24333:2009 ou com as normas de amostragem 124 da GAFTA, aplicadas pelos operadores das empresas do setor alimentar para garantir o cumprimento das disposições constantes da legislação, é equivalente à das normas de amostragem definidas na parte L.

Para a amostragem dos lotes relativamente às toxinas *Fusarium*, a aplicação de normas de amostragem em conformidade com a norma EN ISO 24333:2009 ou com as normas de amostragem 124 da GAFTA, aplicadas pelos operadores das empresas do setor alimentar para garantir o cumprimento das disposições constantes da legislação, é equivalente à das normas de amostragem estabelecidas na parte B.»;

- b) Na parte B.2, o quadro 1 é substituído pelo quadro seguinte:

«Quadro 1

Subdivisão dos lotes em sublotos em função do produto e do peso do lote

Produto	Peso do lote (toneladas)	Peso ou número de sublotos	Número de amostras elementares	Peso da amostra global (kg)
Cereais e produtos à base de cereais	> 300 e < 1 500	3 sublotos	100	10
	≥ 50 e ≤ 300	100 toneladas	100	10
	< 50	—	3-100 (*)	1-10

(*) Consoante o peso do lote — ver quadro 2.»;

- c) No ponto B.3, é aditada a seguinte frase no final do primeiro travessão:

«Para os lotes > 500 toneladas, o número de amostras elementares é o previsto no anexo I, parte L.2.»;

- d) Na parte D.2, após o primeiro período é inserido o seguinte texto:

«Este método de amostragem é igualmente aplicável ao controlo oficial dos teores máximos fixados para a ocratoxina A, a aflatoxina B1 e as aflatoxinas totais nas especiarias com partículas de dimensões relativamente grandes (partículas de dimensões comparáveis a amendoins ou ainda maiores, por exemplo, a noz-moscada).»;

- e) Na parte E, o primeiro período passa a ter a seguinte redação:

«Este método de amostragem aplica-se ao controlo oficial dos teores máximos fixados para a ocratoxina A, a aflatoxina B1 e as aflatoxinas totais em especiarias, exceto nos casos das especiarias com partículas de dimensões relativamente grandes (distribuição heterogénea da contaminação com micotoxinas).»;

- f) Na parte I, o primeiro subtítulo e a primeira frase passam a ter a seguinte redação:

I. MÉTODO DE AMOSTRAGEM PARA PRODUTOS SÓLIDOS À BASE DE MAÇÃ

Este método de amostragem aplica-se ao controlo oficial dos teores máximos fixados para a patulina em produtos sólidos à base de maçã destinados a lactentes e a crianças jovens.»;

- g) Na parte I.1, segundo parágrafo, são suprimidas as seguintes frases:

«No caso de produtos líquidos, o lote deve ser cuidadosamente misturado, tanto quanto possível, quer manual quer mecanicamente, imediatamente antes da colheita de amostras. Nestas condições, pode pressupor-se que a distribuição de patulina num determinado lote é homogénea. É, por conseguinte, suficiente colher três amostras elementares de um lote, a fim de constituir uma amostra global.»

- h) São aditadas as novas partes L e M, cujo texto consta do anexo I do presente regulamento.

- 2) No anexo II, os pontos 4.2, «Requisitos gerais», 4.3., «Requisitos específicos», e 4.4, «Estimativa da incerteza de medição, cálculo da taxa de recuperação e registo dos resultados», são substituídos pelo texto que consta do anexo II 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 aplicável a partir de 1 de julho de 2014.

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

Feito em Bruxelas, em 16 de maio de 2014.

Pela Comissão
O Presidente
José Manuel BARROSO

ANEXO I

«L. MÉTODO DE AMOSTRAGEM PARA LOTES MUITO GRANDES OU LOTES ARMAZENADOS OU TRANSPORTADOS DE TAL FORMA QUE A AMOSTRAGEM DO LOTE NÃO SEJA EXEQUÍVEL

L.1. **Princípios gerais**

Sempre que o tipo de transporte ou armazenagem de um lote não permita colher amostras elementares em todo o lote, a amostragem deve ser, de preferência, efetuada enquanto o lote estiver em movimento (amostragem dinâmica).

No caso de grandes armazéns destinados a alimentos para animais, os operadores devem ser incentivados a instalar equipamentos nos armazéns que permitam uma amostragem (automática) em todo o lote armazenado.

Quando os procedimentos de amostragem previstos na presente parte L são aplicados, o operador da empresa do setor alimentar ou o seu representante devem ser informados sobre o procedimento de amostragem. Se os referidos procedimentos de amostragem forem questionados pelo operador de uma empresa do setor alimentar ou pelo seu representante, o operador de uma empresa do setor alimentar ou o seu representante devem permitir que a autoridade competente proceda à amostragem em todo o lote a suas expensas.

A amostragem de uma parte do lote é autorizada, na condição de que a quantidade da parte incluída na amostra seja, pelo menos, de 10 % do lote a amostrar. Se uma parte de um lote de alimentos da mesma categoria ou descrição tiver sido sujeita a amostragem e identificada como não cumprindo os requisitos da União, presume-se que a totalidade do lote é também afetada, a menos que, na sequência de uma avaliação rigorosa, não sejam detetados indícios de que o resto do lote não cumpre os requisitos da UE.

As disposições pertinentes, tais como o peso da amostra elementar, previstas noutras partes do presente anexo, são aplicáveis para a amostragem de lotes muito grandes ou de lotes armazenados ou transportados de tal forma que a amostragem do lote não seja exequível.

L.2. **Número de amostras elementares a colher no caso de grandes lotes**

No caso dos grandes porções incluídas na amostra (porções incluídas na amostra > 500 toneladas), o número de amostras elementares a colher = 100 amostras elementares + $\sqrt{\text{toneladas}}$. Contudo, se o lote tiver menos de 1 500 toneladas e puder ser subdividido em sublotes em conformidade com o quadro 1 da parte B, e sob condição de que os sublotes possam ser fisicamente separados, deve ser colhido o número de amostras elementares previsto na parte B.

L.3. **Lotes grandes transportados por navio**

L.3.1. *Amostragem dinâmica de lotes grandes transportados por navio*

A amostragem de lotes grandes nos navios deve ser preferencialmente realizada enquanto o produto está em movimento (amostragem dinâmica).

A amostragem é feita por porão, podendo os porões estar fisicamente separados. Todavia, os porões são esvaziados parcialmente, um após o outro, deixando essa separação física inicial de existir após a transferência para as instalações de armazenamento. A amostragem pode, portanto, ser efetuada em função da separação física inicial ou da separação existente após transferência para as instalações de armazenamento.

A descarga de um navio pode durar vários dias. Normalmente, as amostras têm de ser colhidas a intervalos regulares durante todo o período de descarga. Contudo, nem sempre é possível ou apropriado para um inspetor oficial estar presente para a amostragem durante toda a operação de descarga. Portanto, está autorizada a amostragem de uma parte do lote (porção amostrada). O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada.

Mesmo quando a amostragem oficial é efetuada de forma automática, é necessária a presença de um inspetor. No entanto, se a amostragem automática utilizar parâmetros preestabelecidos que não possam ser alterados durante a amostragem e se as amostras elementares forem colhidas num recipiente selado, impedindo qualquer possível fraude, a presença de um inspetor só é exigida no início da amostragem, de cada vez que tenha de ser mudado o recipiente das amostras e no final da amostragem.

L.3.2. *Amostragem estática de lotes transportados por navio*

No caso de a amostragem ser realizada de forma estática, têm de ser aplicados os procedimentos previstos para as instalações de armazenagem (silos) acessíveis pelo topo (ver ponto L.5.1).

A amostragem tem de ser efetuada através da parte acessível (do topo) do lote/porão. O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada.

L.4. Amostragem de lotes grandes armazenados em armazéns

A amostragem tem de ser efetuada através da parte acessível do lote. O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada.

L.5. Amostragem de instalações de armazenagem (silos)**L.5.1. Amostragem de silos (facilmente) acessíveis pelo topo**

A amostragem tem de ser efetuada através da parte acessível do lote. O número de amostras elementares é determinado em função da dimensão da porção amostrada.

L.5.2. Amostragem de silos não acessíveis pelo topo (silos fechados)**L.5.2.1. Silos não acessíveis pelo topo (silos fechados) com uma dimensão > 100 toneladas**

Os alimentos armazenados neste tipo de silos não podem ser amostrados de forma estática. Por conseguinte, sempre que os alimentos no silo tenham de ser amostrados e não exista possibilidade de mover a remessa, é estabelecido um acordo com o operador no sentido de informar o inspetor sobre o momento em que o silo será descarregado, parcial ou completamente, para que possa ser realizada uma amostragem dinâmica dos alimentos.

L.5.2.2. Silos não acessíveis pelo topo (silos fechados) com uma dimensão < 100 toneladas

Ao contrário do disposto no ponto L.1 (parte incluída na amostra, pelo menos, 10 %), o procedimento de amostragem consiste na introdução num recipiente de uma quantidade de 50 a 100 kg e a colheita da amostra do mesmo. A dimensão da amostra global corresponde ao conjunto do lote e o número de amostras elementares é determinado em função da quantidade de alimentos libertada do silo para o recipiente de amostragem.

L.6. Amostragem de alimentos a granel em contentores grandes fechados

Muitas vezes, estes lotes só podem ser amostrados quando descarregados. Em determinados casos, não é possível proceder à descarga no ponto de importação ou de controlo, devendo a amostragem ter lugar quando os contentores são descarregados. O operador tem de informar o inspetor sobre o local e a hora de descarga dos recipientes.

M. MÉTODO DE AMOSTRAGEM DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE ARROZ FERMENTADO COM LEVEDURA VERMELHA *MONASCUS PURPUREUS*

Este método de amostragem é aplicável ao controlo oficial do teor máximo estabelecido para a citrinina em suplementos alimentares à base de arroz fermentado com levedura vermelha *Monascus purpureus*.

Procedimento de colheita de amostras e dimensão da amostra

O processo de amostragem assenta no pressuposto de que os suplementos alimentares à base de arroz fermentado com levedura vermelha *Monascus purpureus* são comercializados em embalagens para venda a retalho que contêm geralmente 30 a 120 cápsulas por embalagem para venda a retalho.

Dimensão do lote (número de embalagens para venda a retalho)	Número de embalagens para venda a retalho a colher para a amostra	Dimensão da amostra
1-50	1	Todas as cápsulas
51-250	2	Todas as cápsulas
251-1 000	4	De cada embalagem para venda a retalho colhida para amostra, metade das cápsulas
> 1 000	4 + 1 embalagens por cada 1 000 embalagens para venda a retalho, até um máximo de 25 embalagens para venda a retalho	≤ 10 embalagens para venda a retalho: por cada embalagem para venda a retalho, metade das cápsulas > 10 embalagens para venda a retalho: por cada embalagem para venda a retalho, é colhido um número igual de cápsulas por forma dar origem a uma amostra contendo o equivalente a cinco embalagens para venda a retalho».

ANEXO II

«4.2. Requisitos gerais

Os métodos de análise utilizados para o controlo dos géneros alimentícios devem cumprir as disposições do anexo III, pontos 1 e 2, do Regulamento (CE) n.º 882/2004.

4.3. Requisitos específicos

4.3.1. Requisitos específicos para métodos de confirmação

4.3.1.1. Critérios de desempenho

Recomenda-se que sejam utilizados, quando adequado e estejam disponíveis, métodos de confirmação plenamente validados (ou seja, métodos validados por ensaio coletivo para a matriz respetiva). Podem igualmente ser utilizados outros métodos de confirmação validados e adequados (por exemplo, métodos validados internamente em matrizes relevantes pertencentes ao grupo de mercadorias pertinente), desde que estes respeitem os critérios de desempenho indicados nos quadros seguintes.

Sempre que possível, a validação de métodos validados internamente devem incluir um material de referência certificado.

a) Critérios de desempenho para as aflatoxinas

Critério	Gama de concentrações	Valor recomendado	Valore máximo autorizado
Em branco	Todas	Negligenciável	—
Recuperação — Aflatoxina M1	0,01-0,05 µg/kg	60 a 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 a 110 %	
Recuperação — Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50 a 120 %	
	1 — 10 µg/kg	70 a 110 %	
	> 10 µg/kg	80 a 110 %	
Reprodutibilidade RSD _R	Todas	Derivada da equação de Horwitz (*)(**)	2 × o valor derivado da equação de Horwitz (*) (**)

A precisão RSD_r pode ser calculada como 0,66 vezes a reprodutibilidade RSD_R na concentração em causa.

Nota:

- Valores a aplicar tanto a B₁ como à soma de B₁ + B₂ + G₁ + G₂
- Se a soma das aflatoxinas individuais B₁ + B₂ + G₁ + G₂ tiver de ser comunicada, a resposta de cada uma delas ao sistema analítico deve ser conhecida ou equivalente.

b) Critérios de desempenho para a ocratoxina A

Teor µg/kg	Ocratoxina A		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperação %
< 1	≤ 40	≤ 60	50 a 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	70 a 110

c) Critérios de desempenho para a patulina

Teor µg/kg	Patulina		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperação %
< 20	≤ 30	≤ 40	50 a 120
20-50	≤ 20	≤ 30	70 a 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 a 105

d) Critérios de desempenho para o desoxinivalenol

Teor µg/kg	Desoxinivalenol		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperação %
≥ 100-≤ 500	≤ 20	≤ 40	60 a 110
> 500	≤ 20	≤ 40	70 a 120

e) Critérios de desempenho para a zearalenona

Teor µg/kg	Zearalenona		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperação %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 a 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 a 120

f) Critérios de desempenho para as fumonisinas B₁ e B₂ separadamente

Teor µg/kg	Fumonisinas B ₁ e B ₂ , separadamente		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperação %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 a 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 a 110

g) Critérios de desempenho para as toxinas T-2 e HT-2 separadamente

Teor µg/kg	Toxinas T-2 e HT-2, separadamente		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperação %
15-250	≤ 30	≤ 50	60 a 130
> 250	≤ 25	≤ 40	60 a 130

h) Critérios de desempenho para a citrinina

Teor µg/kg	Citrinina			
	RSD _r %	RSD _R % recomendado	RSD _R % máximo permitido	Recuperação %
Todas	0,66 × RSD _R	Derivada da equação de Horwitz (*) (**)	2 × o valor derivado da equação de Horwitz (*) (**)	70 a 120

i) Notas relativas aos critérios de desempenho para as micotoxinas:

- Os limites de deteção dos métodos utilizados não são indicados, visto que os valores relativos à precisão são dados para as concentrações pertinentes.
- Os valores relativos à precisão são calculados com base na equação de Horwitz, em especial, a equação de Horwitz original (equação de Horwitz para concentrações $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) e a equação de Horwitz modificada para concentrações $C < 1,2 \times 10^{-7}$ (**).

(*) Equação de Horwitz para concentrações $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

(ref.^a: W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, *J.Assoc.Off.Analy.Chem.*, 1980, 63, 1344)

(**) Equação de Horwitz modificada para concentrações $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$RSD_R = 22 \%$$

(ref.^a: M. Thompson, *Analyst*, 2000, 125, p. 385-386)

em que:

- RSD_R é o desvio-padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade $[(sR) \times 100]$
- C é a taxa de concentração (ou seja, 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Trata-se de uma equação geral relativa à precisão, que se considerou ser independente da substância analisada e da matriz, mas dependente apenas da concentração para a maior parte dos métodos de análise de rotina.

4.3.1.2. Abordagem “adequação à finalidade”

No que se refere aos métodos validados internamente, pode utilizar-se, como alternativa, uma abordagem “de adequação à finalidade” para se avaliar a adequabilidade desses métodos para o controlo oficial. Os métodos adequados para o controlo oficial têm de produzir resultados cuja incerteza-padrão de medição (u) seja inferior à incerteza-padrão de medição máxima, calculada por meio da fórmula seguinte:

$$Uf = \sqrt{(\text{LOD}/2)^2 + (\alpha \times C)^2}$$

em que:

- Uf representa a incerteza-padrão de medição máxima ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
- LOD representa o limite de deteção do método ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
- α é um fator numérico constante a utilizar dependendo do valor de C. Os valores a utilizar constam do quadro *infra*.
- C corresponde à concentração pertinente ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Se um método analítico produzir resultados cuja incerteza de medição seja inferior à incerteza-padrão máxima, esse método será considerado tão adequado quanto um método que respeite os critérios de desempenho indicados no ponto 4.3.1.1.

Quadro

Valores numéricos a utilizar para α como constante na fórmula acima indicada, em função da concentração pertinente

C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	α
≤ 50	0,2
51-500	0,18
501-1 000	0,15
1 001-10 000	0,12
$> 10 000$	0,1

(***) Ref.^a: M. Thompson and R. Wood, *Accred. Qual. Assur.*, 2006, 10, p. 471-478.

4.3.2. Requisitos específicos para métodos de rastreio semiquantitativos

4.3.2.1. Âmbito de aplicação

O âmbito de aplicação abrange os métodos bioanalíticos baseados em imuno-reconhecimento ou em ligações aos recetores (tais como o teste ELISA, indicadores de nível, dispositivos de fluxo lateral, imunossensores) e métodos físico-químicos baseados em cromatografia ou em deteção direta por espetrometria de massa (por exemplo, espetrometria de massa — MS ambiente). Não estão excluídos outros métodos (por exemplo, cromatografia em camada fina), desde que os sinais emitidos estejam diretamente relacionados com as micotoxinas em causa e permitam que o princípio descrito mais adiante possa ser aplicado.

Os requisitos específicos aplicam-se a métodos cujo resultado de medição é um valor numérico, por exemplo uma resposta (relativa) de um leitor de indicador de nível, um sinal de LC-MS, etc., e a que as estatísticas normais sejam aplicáveis.

Os requisitos não se aplicam a métodos que não tenham como resultado valores numéricos (por exemplo, apenas uma linha que está presente ou ausente), que exigem diferentes abordagens de validação. São apresentados requisitos específicos para estes métodos no ponto 4.3.3.

O presente documento descreve os procedimentos para a validação dos métodos de rastreio através de uma validação interlaboratorial, a verificação do desempenho de um método validado através de um exercício interlaboratorial e a validação de um método de rastreio por um único laboratório.

4.3.2.2. Terminologia

Concentração de rastreio visada (STC): a concentração pertinente para a deteção de micotoxinas numa amostra. Quando o objetivo é o de testar o cumprimento dos valores-limite regulamentares, a STC é igual ao limite máximo aplicável. Para outros fins, ou se não tiver sido estabelecido um limite máximo, a STC é predefinida pelo laboratório.

Método de rastreio: o método utilizado para a seleção das amostras com teores de micotoxinas que excedem a concentração de rastreio visada (STC), com um determinado nível de confiança. Para efeitos de rastreio das micotoxinas, um nível de confiança de 95 % é considerado adequado à finalidade em causa. O resultado da análise de rastreio é “negativo” ou “suspeito”. Os métodos de rastreio devem permitir uma boa relação custo-eficácia, aumentando assim a possibilidade de descobrir novos incidentes com elevada exposição e riscos para a saúde dos consumidores. Estes métodos devem ser baseados em métodos bioanalíticos, LC-MS ou HPLC. Os resultados de amostras que excederem o valor-limite devem ser verificados através de uma reanálise completa da amostra original com recurso a um método de confirmação.

“Amostra negativa”: o teor de micotoxinas na amostra é $< STC$, com um nível de confiança de 95 % (ou seja, existem 5 % de probabilidades de que as amostras sejam incorretamente registadas como negativas).

“Amostra falsa negativa”: o teor de micotoxinas na amostra é $> STC$, mas foi identificado como negativo.

“Amostra suspeita” (rastreo positivo): a amostra excede o valor-limite (ver *infra*) e o seu teor de micotoxina pode situar-se a um nível superior à STC. Qualquer resultado suspeito desencadeia uma análise de confirmação para uma identificação inequívoca e quantificação da micotoxina.

“Amostra falsa suspeita”: uma amostra negativa que foi identificada como suspeita.

“Métodos de confirmação”: métodos que fornecem indicações completas ou complementares que permitem a identificação e a quantificação inequívoca da micotoxina ao nível pertinente.

Valor-limite: a resposta, a indicação ou concentração, obtida através do método de rastreio, acima da qual a amostra é classificada como “suspeita”. O valor-limite é determinado durante a validação e tem em conta a variabilidade da medição.

Amostra de controlo negativo (matriz em branco): uma amostra conhecida como estando isenta ⁽¹⁾ da micotoxina objeto de rastreio, por exemplo, devido a uma determinação anterior em que se utilizou um método de confirmação com sensibilidade suficiente. Se não podem ser obtidas amostras em branco, pode ser utilizado material com o menor nível alcançável, desde que o nível permita concluir que o método de rastreio é adequado à sua finalidade.

Amostra de controlo positiva: amostra que contém a micotoxina à concentração de rastreio visada (por exemplo, um material de referência certificado, um material com um teor conhecido, um material de testes de aptidão) ou suficientemente caracterizada através de um método de confirmação. Na ausência de qualquer dos métodos *supra*, pode ser utilizada uma mistura de amostras com níveis de contaminação diferentes ou uma amostra enriquecida, elaborada no laboratório e suficientemente caracterizada, desde que se possa provar que o nível de contaminação foi verificado.

4.3.2.3. Processo de validação

O objetivo da validação é demonstrar a adequação do método de rastreio à sua finalidade. Tal é feito por meio da determinação do valor-limite e pela determinação da taxa de falsos negativos e falsos suspeitos. Nestes dois parâmetros, estão incluídas características de desempenho, tais como a sensibilidade, a seletividade e a precisão.

Os métodos de rastreio podem ser validados pela validação interlaboratorial ou por um único laboratório. Se já estiverem disponíveis dados de validação interlaboratorial para uma certa combinação micotoxina/matriz/STC, é suficiente a verificação de desempenho do método num laboratório que aplique o método.

4.3.2.3.1. Validação inicial por validação por um único laboratório

Micotoxinas:

A validação deve ser realizada para cada micotoxina separadamente dentro do âmbito de aplicação. No caso dos métodos bioanalíticos que dão uma resposta combinada para um determinado grupo de micotoxinas (por exemplo, as aflotoxinas B₁, B₂, G₁ & G₂ e as fumonisinas B₁ & B₂), a aplicabilidade deve ser demonstrada e as limitações do teste indicadas no âmbito de aplicação do método. Não se considera que a reatividade cruzada indesejável (e.g. DON-3-glicósido, 3- ou 15- acetil-DON para métodos baseados na imunologia para DON) aumente a percentagem de falsos negativos das micotoxinas-alvo, mas pode aumentar a percentagem de falsos suspeitos. Este aumento não desejado será atenuado por análises de confirmação para identificar e quantificar as micotoxinas de forma inequívoca.

Matrizes:

Uma validação inicial deve ser executada para cada mercadoria, ou, quando o método for reconhecidamente aplicável a várias mercadorias, para cada grupo de mercadorias. Neste último caso, é selecionada uma mercadoria representativa e relevante nesse grupo (ver quadro A).

Conjunto de amostras:

O número mínimo de diferentes amostras necessárias para fins de validação são 20 amostras de controlo negativo homogéneas e 20 amostras de controlo positivas homogéneas que contenham a micotoxina na STC, analisadas em condições de precisão intermédia (RSD_{R_i}), ao longo de cinco dias diferentes. Em alternativa, conjuntos suplementares de 20 amostras que contenham micotoxinas a outros níveis podem ser adicionadas ao conjunto de validação para compreender até que ponto o método permite distinguir entre diferentes concentrações de micotoxinas.

Concentração:

Para cada STC a utilizar na aplicação de rotina, tem de ser efetuada uma validação.

4.3.2.3.2. Validação inicial através de testes interlaboratoriais

A validação através de ensaios interlaboratoriais deve ser feita em conformidade com um protocolo internacional reconhecido relativo a testes interlaboratoriais (por exemplo, a norma ISO 5725:1994 ou o Protocolo Internacional Harmonizado da IUPAC), que requer a inclusão de dados válidos de oito diferentes laboratórios, no mínimo. Além disso, a única diferença em comparação com as validações por um único laboratório é que as amostras ≥ 20 por produto/nível podem ser equitativamente repartidas entre os laboratórios participantes, com um mínimo de duas amostras por laboratório.

⁽¹⁾ As amostras são consideradas indemnes da substância a analisar se a quantidade presente na amostra não exceder mais de 1/5 da STC. Se o nível puder ser quantificado com um método de confirmação, esse nível deve ser tomado em consideração para a avaliação da validação.

4.3.2.4. Determinação do valor-limite e da percentagem de resultados falsos suspeitos das amostras em branco

As respostas (relativas) para as amostras de controlo negativas e positivas são tomadas como base para o cálculo dos parâmetros requeridos.

Métodos de rastreio com uma resposta proporcional à concentração de micotoxinas

Para métodos de rastreio com uma resposta proporcional à concentração de micotoxinas, aplica-se o seguinte:

$$\text{Valor-limite} = R_{STC} - \text{valor } t_{0,05} * SD_{STC}$$

R_{STC} = resposta média das amostras de controlo positivas (à STC)

valor t: um valor t para uma percentagem de resultados falsos negativos de 5 % (ver quadro B)

SD_{STC} = desvio-padrão

Métodos de rastreio com uma resposta inversamente proporcional à concentração de micotoxinas

De modo similar, para métodos de rastreio com uma resposta inversamente proporcional à concentração de micotoxinas, o valor-limite é determinado da seguinte forma:

$$\text{Valor-limite} = R_{STC} + \text{valor } t_{0,05} * SD_{STC}$$

Utilizando este valor t específico para estabelecer o valor-limite, a percentagem de resultados falsos negativos é, por defeito, fixada em 5 %.

Avaliação da adequação ao objetivo

Os resultados das amostras de controlo negativas são utilizados para estimar a percentagem correspondente de resultados falsos suspeitos. O valor t é calculado de forma correspondente ao caso em que um resultado de uma amostra de controlo negativo é superior ao valor-limite, sendo, portanto, erradamente classificado como suspeito.

Valor t = $(\text{valor-limite} - \text{média}_{\text{branco}}) / SD_{\text{branco}}$ Para métodos de rastreio com uma resposta proporcional à concentração de micotoxinas

ou

Valor t = $(\text{média}_{\text{branco}} - \text{valor-limite}) / SD_{\text{branco}}$ Para métodos de rastreio com uma resposta inversamente proporcional à concentração de micotoxinas

A partir do valor t obtido, e com base nos graus de liberdade calculados com base no número de experiências, a probabilidade de amostras falsas suspeitas para uma distribuição unicaudal pode ser calculada (por exemplo, função da folha de cálculo "TDIST") ou retirada de um quadro de distribuição-t.

O valor correspondente da distribuição-t unicaudal especifica a percentagem de resultados falsos suspeitos.

Este conceito é descrito em pormenor, com um exemplo, em *Analytical and Bioanalytical Chemistry*: DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5. Alargamento do âmbito de aplicação do método

4.3.2.5.1. Alargamento do âmbito de aplicação a outras micotoxinas:

Quando as novas micotoxinas são adicionadas ao âmbito de um dos métodos de rastreio existentes, é necessária uma validação completa para demonstrar a adequação do método.

4.3.2.5.2. Extensão a outras mercadorias:

Se o método de rastreio for conhecido ou se preveja que venha a ser aplicável a outras mercadorias, a validade destas outras mercadorias deve ser verificada. Desde que a nova mercadoria pertença a um grupo de mercadorias (ver quadro A) para as quais já foi realizada uma validação inicial, uma validação adicional limitada é suficiente. Para tal, um mínimo de 10 amostras homogêneas de controlo negativas e 10 amostras homogêneas de controlo positivas (à STC) devem ser analisadas em condições de precisão intermédia. As amostras de controlo positivas devem ser superiores ao valor-limite. No caso de este critério não ser preenchido, é exigida uma validação completa.

4.3.2.6. Verificação dos métodos já validados através de testes interlaboratoriais

Para os métodos de rastreio que já tenham sido adequadamente validados por um teste interlaboratorial, deve ser verificado o desempenho do método. Deve ser analisado um mínimo de 6 amostras de controlo negativas e de 6 amostras de controlo positivas (à STC). As amostras de controlo positivas devem ser superiores ao valor-limite. No caso de este critério não estar preenchido, o laboratório tem de efetuar uma análise das causas profundas, a fim de identificar a razão por que não pôde cumprir as especificações obtidas no ensaio interlaboratorial. Só depois de tomar medidas corretivas se deve reexaminar o desempenho do método no respetivo laboratório. Caso o laboratório não seja capaz de verificar os resultados do ensaio interlaboratorial, terá de estabelecer o seu valor-limite numa validação completa por um único laboratório.

4.3.2.7. Método de verificação contínuo/método de validação em curso

Após a validação inicial, os dados de validação adicionais são obtidos incluindo, pelo menos, duas amostras de controlo positivas para cada lote de amostras objeto de rastreio. Uma amostra de controlo positiva é uma amostra conhecida (por exemplo, utilizada durante a validação inicial), a outra é um produto diferente do mesmo grupo de mercadorias (no caso de ser analisada apenas uma mercadoria, é utilizada uma amostra diferente dessa mercadoria em seu lugar). A inclusão de uma amostra de controlo negativa é facultativa. Os resultados obtidos para as duas amostras de controlo positivas são acrescentados ao conjunto de validação existente.

Pelo menos uma vez por ano, o valor-limite e a validade do método são reapreciados. O método verificação contínua serve diversos objetivos:

- Controlo de qualidade para o lote de amostras rastreado
- Fornecimento de informações sobre a solidez do método nas condições do laboratório que aplica o método
- Justificação da aplicabilidade do método a diferentes mercadorias
- Possibilidade de ajustar os valores-limite em caso de dispersão gradual ao longo do tempo.

4.3.2.8. Relatório de validação

O relatório de validação deve conter:

- Uma declaração sobre a STC
- Uma declaração sobre o valor-limite obtido.

Nota: O valor-limite deve ter o mesmo número de algarismos significativos que a STC. Os valores numéricos a utilizar para calcular o valor-limite precisam, pelo menos, de mais um algarismo significativo do que a STC.

- Uma declaração sobre a percentagem calculada de falsos suspeitos
- Uma declaração sobre a forma como foi gerada a percentagem de falsos suspeitos.

Nota: A declaração sobre o cálculo da percentagem de falsos suspeitos indica se o método é adequado à sua finalidade, tal como indica o número de amostras em branco (ou com reduzida contaminação) que serão sujeitas a verificação.

Quadro A

Grupos de mercadorias para a validação de métodos de rastreio

Grupos de mercadorias	Categorias de mercadorias	Mercadorias típicas representativas incluídas na categoria
Elevado teor de água	Sumos de fruta	Sumo de maçã, sumo de uva
	Bebidas alcoólicas	Vinho, cerveja, sidra
	Raízes e tubérculos	Gengibre fresco
	Cereais ou purés à base de fruta	Purés destinados a lactentes ou crianças jovens

Grupos de mercadorias	Categorias de mercadorias	Mercadorias típicas representativas incluídas na categoria
Elevado teor de óleo	Frutos de casca rija	Avelãs, nozes comuns, castanhas
	Sementes oleaginosas e seus produtos	Colza, girassol, algodão, soja, amendoim, sésamo, etc.
	Frutos e produtos oleaginosos	Óleos e pastas (por ex., manteiga de amendoim, <i>tahina</i>)
Elevado teor de amido e/ou de proteínas e baixo teor de água e de matéria gorda	Sementes ou frutos oleaginosos e seus produtos	Trigo, centeio, cevada, arroz, milho, arroz, pão integral, pão branco, bolachas salgadas (<i>crackers</i>), cereais de pequeno-almoço, massas
	Produtos dietéticos	Produtos em pó secos para a preparação de alimentos para lactentes e crianças jovens
Elevado teor de ácidos e elevado teor de água (*)	Produtos de citrinos	
“Mercadorias difíceis ou únicas” (**)		Cacau em grão e seus produtos Café, chá Especiarias, alcaçuz
Elevado teor de açúcar, baixo teor de água	Frutos secos	Figos, uvas, passas, sultanas
Leite e produtos lácteos	Leite	Leite de vaca, ovelha ou búfala
	Queijo	Leite de vaca ou de ovelha
	Produtos lácteos (por exemplo, leite em pó)	logurte, natas

(*) Se for utilizado um tampão para estabilizar as alterações do pH durante a fase da extração, este grupo de mercadorias pode ser fundido num só grupo de mercadorias com “Elevado teor de água”.

(**) As “mercadorias difíceis ou únicas” só devem ser plenamente validadas se forem frequentemente analisadas. Se forem analisadas apenas ocasionalmente, a validação pode ser reduzida a um mero controlo dos níveis declarados utilizando extratos em branco enriquecidos.

Quadro B

Valor t unicaudal para uma percentagem de 5 % de falsos negativos

Graus de liberdade	Número de repetições	Valor t (5 %)
10	11	1,812
11	12	1,796
12	13	1,782
13	14	1,771
14	15	1,761
15	16	1,753
16	17	1,746
17	18	1,74
18	19	1,734

Graus de liberdade	Número de repetições	Valor t (5 %)
19	20	1,729
20	21	1,725
21	22	1,721
22	23	1,717
23	24	1,714
24	25	1,711
25	26	1,708
26	27	1,706
27	28	1,703
28	29	1,701
29	30	1,699
30	31	1,697
40	41	1,684
60	61	1,671
120	121	1,658
∞	∞	1,645

4.3.3. Requisitos para métodos de rastreio qualitativos (métodos de que não resultam valores numéricos)

O desenvolvimento de orientações de validação para métodos de testes binários é atualmente objeto de vários organismos de normalização (por exemplo, AOAC, ISO). Muito recentemente a AOAC elaborou uma diretriz sobre esta matéria. O presente documento pode ser considerado como o estado atual da técnica neste domínio. Por conseguinte, os métodos que dão resultados binários (p. ex., inspeção visual de testes de nível) devem ser validados de acordo com a presente orientação:

http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ISPAM/Qual_Chem_Guideline_Final_Approved_031412.pdf

4.4. Estimativa da incerteza de medição, cálculo da recuperação e registo dos resultados ⁽¹⁾

4.4.1. Métodos de confirmação

O resultado analítico deve ser registado do seguinte modo:

- Corrigido em função da recuperação, indicando-se o nível de recuperação. Se a percentagem de recuperação se situar entre 90 % e 110 % não é necessário efetuar a correção;
- Como “x +/- U”, em que “x” é o resultado analítico e “U” é a incerteza da medição expandida, utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %.

Para os alimentos de origem animal, a incerteza de medição pode também ser levada em linha de conta através do estabelecimento do limite de decisão (CCa), em conformidade com a Decisão 2002/657/CE da Comissão ⁽²⁾ (ponto 3.1.2.5 do anexo I — o caso das substâncias relativamente às quais não se encontra definido um limite permitido).

Todavia, se o resultado da análise for significativamente inferior (> 50 %) ao nível máximo ou muito superior ao nível máximo (por exemplo, mais de cinco vezes o nível máximo) e na condição de terem sido aplicados os procedimentos de qualidade adequados e de que a análise sirva apenas o propósito de verificar o cumprimento das disposições, o resultado analítico pode ser notificado sem correção de recuperação, podendo omitir-se, nestes casos, o registo da percentagem de recuperação e da incerteza de medição.

⁽¹⁾ Informações mais detalhadas sobre os procedimentos destinados a estimar a incerteza de medição e a avaliar a recuperação podem ser consultados no “Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation” — http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf

⁽²⁾ Decisão 2002/657/CE da Comissão, de 14 de agosto de 2002, que dá execução à 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).

As presentes regras de interpretação do resultado analítico, tendo em vista a aceitação ou rejeição do lote, aplicam-se ao resultado analítico obtido com a amostra para controlo oficial. Nos casos em que se efetuem análises para efeitos de defesa ou procedimentos de arbitragem, aplicam-se as normas nacionais.

4.4.2. *Métodos de rastreio*

O resultado do rastreio deve ser expresso como conforme ou como suspeito de não conformidade.

“Suspeito de não conformidade”: a amostra excede o valor-limite e o seu teor da micotoxina pode ser superior à STC. Qualquer resultado suspeito desencadeia uma análise de confirmação para uma identificação inequívoca e quantificação da micotoxina.

“Conforme”: o teor de micotoxina na amostra é $< \text{STC}$, com um nível de confiança de 95 % (ou seja, existem 5 % de probabilidades de que as amostras sejam incorretamente registadas como negativas). O resultado analítico é indicado como “ $< \text{nível de STC}$ ” com o nível de STC especificado.»
