

II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 12 de Agosto de 2002

que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados

[notificada com o número C(2002) 3044]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2002/657/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE ⁽¹⁾, e, nomeadamente, o n.º 1, segundo parágrafo, do seu artigo 15.º,

Considerando o seguinte:

- (1) A presença de resíduos em produtos de origem animal é motivo de preocupação em termos de saúde pública.
- (2) A Decisão 98/179/CE da Comissão, de 23 de Fevereiro de 1998, que estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos ⁽²⁾, determina que a análise das amostras deve ser efectuada exclusivamente por laboratórios aprovados pela autoridade nacional competente para o controlo oficial de resíduos.
- (3) É necessário garantir a qualidade e a comparabilidade dos resultados analíticos originados por laboratórios aprovados para o controlo oficial de resíduos. Para o efeito, devem usar-se sistemas de garantia da qualidade e, especificamente, aplicar métodos validados em conformidade com procedimentos e critérios de desempenho comuns e garantir a rastreabilidade relativamente a normas comuns ou acordadas em comum.
- (4) A Directiva 93/99/CEE do Conselho, de 29 de Outubro de 1993, relativa a medidas adicionais respeitantes ao controlo oficial dos géneros alimentícios ⁽³⁾, e a Decisão 98/179/CE exigem que os laboratórios oficiais de controlo sejam acreditados em conformidade com a norma ISO 17025 (1) a partir de Janeiro de 2002. Nos termos da Decisão 98/179/CE, os laboratórios autorizados terão de participar num programa externo internacionalmente reconhecido de avaliação e acreditação do controlo de qualidade. Além disso, os laboratórios autorizados devem provar a sua competência participando regularmente e com êxito em programas de comprovação de capacidade reconhecidos ou organizados pelos laboratórios de referência nacionais ou comunitários.
- (5) Para melhorar a coordenação, existe, ao abrigo da Directiva 96/23/CE, uma rede de laboratórios comunitários de referência, laboratórios nacionais de referência e laboratórios nacionais de controlo.
- (6) Em resultado dos avanços em química analítica desde a adopção da Directiva 96/23/CE, o conceito de métodos de rotina e de métodos de referência foi substituído por uma abordagem baseada em critérios, na qual se estabelecem critérios de desempenho e procedimentos para a validação de métodos de triagem e de confirmação.
- (7) É necessário determinar critérios comuns para a interpretação dos resultados dos ensaios efectuados pelos laboratórios oficiais de controlo por forma a garantir uma implementação harmonizada da Directiva 96/23/CE.
- (8) É necessário prever o estabelecimento progressivo de limites mínimos de desempenho requerido (LMDR) dos métodos analíticos para as substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido e, em especial, para as substâncias cuja utilização não seja autorizada ou seja expressamente proibida na Comunidade, por forma a garantir uma implementação harmonizada da Directiva 96/23/CE.

⁽¹⁾ JO L 125 de 23.5.1996, p. 10.

⁽²⁾ JO L 65 de 5.3.1998, p. 31.

⁽³⁾ JO L 290 de 24.11.1993, p. 14.

- (9) A Decisão 90/515/CEE da Comissão, de 26 de Setembro de 1990, que adopta os métodos de referência para a pesquisa de resíduos de metais pesados e de arsénio ⁽¹⁾, a Decisão 93/256/CEE da Comissão, de 14 de Abril de 1993, que estabelece os métodos a utilizar para a pesquisa de resíduos de substâncias com efeito hormonal e de substâncias com efeito tireostático ⁽²⁾, e a Decisão 93/257/CEE da Comissão, de 15 de Abril de 1993, que estabelece os métodos de referência e a lista dos laboratórios nacionais de referência para a pesquisa de resíduos ⁽³⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Decisão 98/536/CE ⁽⁴⁾, foram reexaminadas a fim de atender à evolução dos conhecimentos científicos e técnicos, tendo-se verificado que estão desactualizadas em termos do seu âmbito de aplicação e das suas disposições, devendo por conseguinte ser revogadas pela presente decisão.
- (10) Deve ser fixado um período transitório, a fim de permitir que os métodos de análise de amostras oficiais sejam adaptados ao disposto na presente decisão.
- (11) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

Objecto e âmbito de aplicação

A presente decisão prevê normas para os métodos analíticos a utilizar na análise de amostras oficiais colhidas em conformidade com o artigo 15.º, n.º 1, segunda frase, da Directiva 96/23/CE e especifica critérios comuns para a interpretação dos resultados analíticos dos laboratórios oficiais de controlo relativamente às referidas amostras.

A presente decisão não se aplica a substâncias relativamente às quais exista legislação comunitária que estabeleça normas mais específicas.

Artigo 2.º

Definições

Para efeitos da presente decisão, são aplicáveis as definições constantes do anexo bem como as da Directiva 96/23/CE.

Artigo 3.º

Métodos analíticos

Os Estados-Membros devem garantir que as amostras oficiais colhidas em conformidade com a Directiva 96/23/CE são analisadas recorrendo a métodos que:

- Estejam documentados em instruções para análises, de preferência conformes com a norma ISO 78-2 (6);
- Estejam conformes com a parte 2 do anexo;
- Tenham sido validados de acordo com os procedimentos descritos na parte 3 do anexo;

⁽¹⁾ JO L 286 de 18.10.1990, p. 33.

⁽²⁾ JO L 118 de 14.5.1993, p. 64.

⁽³⁾ JO L 118 de 14.5.1993, p. 75.

⁽⁴⁾ JO L 251 de 11.9.1998, p. 39.

- d) Respeitem os limites mínimos de desempenho requerido (LMDR) relevantes a estabelecer em conformidade com o artigo 4.º

Artigo 4.º

Limites mínimos de desempenho requerido

A presente decisão deverá ser revista de modo a estabelecer progressivamente os limites mínimos de desempenho requerido (LMDR) dos métodos analíticos a utilizar para substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido.

Artigo 5.º

Controlo de qualidade

Os Estados-Membros assegurarão a qualidade dos resultados das análises às amostras colhidas em conformidade com a Directiva 96/23/CE, em especial através de testes de monitorização e/ou de resultados de calibração, em conformidade com o capítulo 5.9 da norma ISO 17025 (1).

Artigo 6.º

Interpretação dos resultados

- O resultado de uma análise deve ser considerado não conforme caso se exceda o limite de decisão do método de confirmação para a substância a analisar.
- Caso se encontre estabelecido um limite permitido relativamente a uma determinada substância, o limite de decisão é a concentração acima da qual se pode decidir, com uma certeza estatística de 1- α , que o limite permitido foi realmente excedido.
- Caso, para uma determinada substância, não se encontre estabelecido um limite permitido, o limite de decisão é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar, com uma certeza estatística de 1- α , se essa substância se encontra presente.
- Relativamente às substâncias enumeradas no grupo A do anexo I da Directiva 96/23/CE, o erro α deverá ser de 1 % ou inferior. Para outras substâncias, o erro α será de 5 % ou inferior.

Artigo 7.º

Revogação

São revogadas as Decisões 90/515/CEE, 93/256/CEE e 93/257/CEE.

Artigo 8.º

Disposições transitórias

Os métodos para análise de amostras oficiais das substâncias referidas no grupo A do anexo I da Directiva 96/23/CE que satisfaçam os critérios estabelecidos nas Decisões 90/515/CEE, 93/256/CEE e 93/257/CEE podem ser utilizados por um período máximo de dois anos após a entrada em vigor da presente decisão. Os métodos actualmente aplicados às substâncias referidas no grupo B do anexo I da Directiva 96/23/CE devem estar conformes com o disposto na presente decisão o mais tardar cinco anos após a data de aplicação da presente decisão.

Artigo 9.º

Data de aplicação

A presente decisão é aplicável a partir de 1 de Setembro de 2002.

Artigo 10.º

Destinatários

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 12 de Agosto de 2002.

Pela Comissão
David BYRNE
Membro da Comissão

ANEXO

CRITÉRIOS DE DESEMPENHO E OUTROS REQUISITOS E PROCEDIMENTOS APLICÁVEIS AOS MÉTODOS ANALÍTICOS**1. DEFINIÇÕES**

- 1.1. Exactidão: grau de concordância entre o resultado dum ensaio e o valor de referência aceite (2). É determinada através da veracidade e da precisão.
- 1.2. Erro alfa (α): probabilidade de a amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme («falsa decisão não conforme»).
- 1.3. Substância a analisar: a substância que se deve detectar, identificar e/ou quantificar bem como as substâncias dela derivadas que se possam formar durante a análise.
- 1.4. Erro alfa (β): probabilidade de a amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme («falsa decisão conforme»).
- 1.5. Desvio sistemático: diferença entre o resultado esperado dum ensaio e um valor de referência aceite (2).
- 1.6. Padrão de calibração: sistema de medição que relaciona a quantidade de substância de interesse com uma base de referência.
- 1.7. Material de referência certificado (MRC): um material com um conteúdo específico de substância a analisar.
- 1.8. Co-cromatografia: um processo em que, antes da execução da cromatografia, o extracto é dividido em duas partes. Uma das partes é submetida a cromatografia sem qualquer tratamento prévio. A outra parte é misturada com o padrão da substância a analisar. Procede-se à cromatografia desta mistura. A quantidade adicionada de padrão de substância a analisar deve ser semelhante ao teor previsto de substância a analisar no extracto. Este método destina-se a melhorar a identificação da substância a analisar quando se utilizam métodos cromatográficos, especialmente quando não se pode usar um padrão interno adequado.
- 1.9. Estudo colaborativo: análise da mesma amostra com o mesmo método para determinar as características de desempenho do método. O estudo abrange as medições de erros aleatórios e o desvio sistemático do laboratório.
- 1.10. Método de confirmação: método que fornece indicações completas ou complementares para a identificação inequívoca de uma substância e, caso necessário, a sua quantificação ao nível requerido.
- 1.11. Limite de decisão (CC α): limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de α .
- 1.12. Capacidade de detecção (CC β): teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de β . Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de $1 - \beta$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração a que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de $1 - \beta$.
- 1.13. Amostra fortificada: uma amostra enriquecida com uma quantidade conhecida da substância a analisar.
- 1.14. Estudo interlaboratorial (comparação): organização, realização e avaliação de ensaios da mesma amostra por dois ou mais laboratórios de acordo com condições pré-estabelecidas para determinar o desempenho dos ensaios. Em função do seu objectivo, o estudo pode ser classificado como estudo colaborativo ou estudo de aptidão.
- 1.15. Padrão interno (PI): uma substância que não se encontra presente na amostra com propriedades físico-químicas tão semelhantes quanto possível às da substância a identificar e que é adicionada a cada amostra bem como a cada padrão de calibração.
- 1.16. Amostra laboratorial: amostra destinada a inspecção ou análise, preparada para envio ao laboratório.
- 1.17. Nível requerido: a concentração da substância a analisar numa amostra que é significativa para determinar a sua conformidade com a legislação.
- 1.18. Limite mínimo de desempenho requerido (LMDR): teor mínimo de uma substância a analisar numa amostra que deve ser detectável e passível de confirmação. Pretende harmonizar-se o desempenho analítico de métodos relativos a substâncias para as quais não se encontre definido um limite permitido.

- 1.19. Característica do desempenho: qualidade funcional que pode ser atribuída a um método analítico. Pode tratar-se, por exemplo, da especificidade, da exactidão, da veracidade, da precisão, da repetibilidade, da reprodutibilidade, da recuperação, da capacidade de detecção ou da robustez.
- 1.20. Critérios de desempenho: requisitos relativos a uma característica do desempenho de acordo com os quais se pode considerar que o método analítico é adequado para o efeito e dá origem a resultados fiáveis.
- 1.21. Limite permitido: um limite máximo de resíduos, um nível máximo ou outra tolerância máxima para uma substância estabelecidos noutros textos da legislação comunitária.
- 1.22. Precisão: grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições (pré-estabelecidas) específicas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. Uma menor precisão é indicada através dum elevado desvio padrão (2).
- 1.23. Estudo de aptidão: análise da mesma amostra permitindo aos laboratórios que escolham os respectivos métodos, desde que estes sejam utilizados em condições de rotina. O estudo deve realizar-se de acordo com os guias ISO 43-1 (3) e 43-2 (4) e pode ser utilizado para avaliar a reprodutibilidade dos métodos.
- 1.24. Método qualitativo: método analítico que identifica uma substância com base nas suas propriedades químicas, biológicas ou físicas.
- 1.25. Método quantitativo: método analítico que determina a quantidade ou a fracção mássica de uma substância de forma a poder exprimi-la através de um valor numérico com as unidade apropriadas.
- 1.26. Ensaio em branco de reagentes: aplicação do método analítico completo, omitindo a toma de ensaio ou utilizando, em vez desta, uma quantidade equivalente de um solvente adequado.
- 1.27. Recuperação: percentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico. É determinada aquando da validação, caso não se encontre disponível um material de referência certificado.
- 1.28. Material de referência: material para o qual se confirmou uma ou várias propriedades por recurso a um método validado, de modo a poder ser utilizado na calibração de um aparelho ou na verificação de um método de medição.
- 1.29. Repetibilidade: precisão em condições de repetibilidade (2).
- 1.30. Condições de repetibilidade: condições de obtenção de resultados de ensaios independentes com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento (2).
- 1.31. Reprodutibilidade: precisão em condições de reprodutibilidade (2)(4).
- 1.32. Condições de reprodutibilidade: condições de obtenção de resultados de ensaios com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, em laboratórios diferentes, com operadores diferentes e utilizando equipamento diferente (2)(4).
- 1.33. Robustez: susceptibilidade de um método analítico a alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como uma lista dos materiais da amostra, das substâncias a analisar, das condições de armazenamento, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas. Relativamente a todas as condições experimentais que possam, na prática, estar sujeitas a variações (por exemplo, estabilidade dos reagentes, composição da amostra, pH, temperatura), devem ser indicadas quaisquer alterações susceptíveis de afectar os resultados analíticos.
- 1.34. Ensaio de amostra branca: aplicação do método analítico completo a uma toma de ensaio retirada de uma amostra isenta da substância a analisar.
- 1.35. Método de triagem: método utilizado para detectar a presença de uma substância ou classe de substâncias ao nível requerido. Estes métodos têm capacidade para processar um número elevado de amostras e são utilizados para seleccionar, de um grande número de amostras, os resultados potencialmente não conformes. São concebidos especificamente para evitar a obtenção de falsos resultados conformes.
- 1.36. Estudo unilaboratorial (validação interna): estudo analítico envolvendo um único laboratório utilizando um método para a análise de material de ensaio idêntico ou diferente, em condições diferentes e ao longo de intervalos de tempo justificadamente longos.
- 1.37. Especificidade: capacidade de um método distinguir a substância a analisar de outras substâncias. Esta característica depende, essencialmente, da técnica de medição descrita, podendo todavia variar de acordo com o tipo de composto ou de matriz.

- 1.38. Adição de padrão: procedimento em que a amostra para ensaio é dividida em duas (ou mais) tomas de ensaio. Uma das tomas é analisada sem qualquer tratamento prévio e às restantes, antes de se proceder à análise, adicionam-se quantidades conhecidas de padrão da substância a analisar. A quantidade de padrão de substância a analisar adicionado deve ser entre duas e cinco vezes o teor previsto de substância a analisar na amostra. Este procedimento destina-se a determinar o teor de uma substância numa amostra, tendo em conta a recuperação do processo analítico.
- 1.39. Padrão de substância a analisar: substância a analisar de teor e pureza conhecidos e certificados, destinada a ser utilizada como referência no processo analítico.
- 1.40. Substância: matéria com composição química específica ou definida e seus metabolitos.
- 1.41. Toma de ensaio: quantidade de material retirado da amostra para ensaio e com base na qual se realiza efectivamente o ensaio ou a observação.
- 1.42. Amostra para ensaio: amostra preparada a partir de uma amostra laboratorial e da qual se deverão retirar as tomas de ensaio.
- 1.43. Veracidade: grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência aceite. A veracidade é geralmente expressa como o desvio sistemático ou enviesamento (2).
- 1.44. Unidades: as unidades descritas na norma ISO 31 (20) e na Directiva 71/354/CEE (19).
- 1.45. Validação: a confirmação, mediante exame, e o fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida (1).
- 1.46. Reprodutibilidade intralaboratorial: precisão obtida no mesmo laboratório em condições (pré-estabelecidas) específicas (relativas, por exemplo, ao método, materiais de ensaio, operadores, ambiente) e ao longo de intervalos de tempo justificadamente longos.

2. CRITÉRIOS DE DESEMPENHO E OUTROS REQUISITOS APLICÁVEIS AOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Além dos métodos descritos *infra*, podem ser utilizados para efeitos de triagem ou confirmação outros métodos analíticos ou combinações de métodos desde que se possa provar que satisfazem os requisitos relevantes estabelecidos na presente decisão.

2.1. REQUISITOS GERAIS

2.1.1. Manipulação das amostras

As amostras devem ser obtidas, manipuladas e tratadas de modo a que a probabilidade de detecção da substância a analisar seja máxima. Os procedimentos para a manipulação das amostras devem evitar a possibilidade de uma contaminação acidental ou da perda das substâncias a analisar.

2.1.2. Execução dos ensaios

2.1.2.1. Recuperação

Durante a análise das amostras, deve determinar-se a recuperação para cada lote de amostras, caso se utilize um factor de correcção da recuperação fixo. Se a recuperação se situar num intervalo limitado, pode então utilizar-se o factor de correcção fixo. Caso contrário, deve usar-se o factor de recuperação obtido para cada lote específico, a menos que se aplique o factor de recuperação específico da substância a analisar na amostra, caso em que deve usar-se o método da adição de padrão (ver ponto 3.5) ou um padrão interno para a determinação quantitativa da substância na amostra.

2.1.2.2. Especificidade

O método deve permitir fazer a distinção entre a substância a analisar e outras substâncias, nas condições experimentais. Deve estimar-se em que medida isto é possível. Devem usar-se estratégias para ultrapassar qualquer interferência previsível de outras substâncias quando se utilizar a técnica de medição descrita, nomeadamente substâncias homólogas, análogas e metabolitos do resíduo em causa. A investigação das interferências susceptíveis de resultar de componentes da matriz é de importância primordial.

2.2. MÉTODOS DE TRIAGEM

Apenas se podem aplicar, para efeitos de triagem, em conformidade com a Directiva 96/23/CE, as técnicas analíticas em relação às quais se possa demonstrar, de forma documentada e reprodutível, que se encontram validadas e têm uma taxa de falsos resultados conformes < 5 % (erro β) ao nível requerido. Em caso de suspeita de um resultado não conforme, este resultado deve ser confirmado através de um método de confirmação.

2.3. MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO PARA RESÍDUOS E CONTAMINANTES ORGÂNICOS

Os métodos de confirmação para resíduos e contaminantes orgânicos devem fornecer informações relativamente à estrutura química da substância a analisar. Consequentemente, os métodos que utilizam apenas a análise cromatográfica, sem recurso a um sistema de detecção baseado na espectrometria, não são adequados para utilização isolada enquanto métodos de confirmação. Contudo, se uma determinada técnica não possuir especificidade suficiente, a especificidade desejada pode ser obtida através de processos analíticos constituídos por combinações adequadas de processos de purificação, separação cromatográfica e detecção espectrométrica.

Os seguintes métodos ou combinações de métodos são considerados adequados para a identificação de resíduos ou contaminantes orgânicos relativamente aos grupos de substâncias indicados:

Quadro 1

Métodos de confirmação adequados para resíduos ou contaminantes orgânicos

Técnica de medição	Substâncias anexo I 96/23/CE	Limitações
LC ou GC com detecção por espectrometria de massa	Grupos A e B	Apenas se usado após uma separação cromatográfica, quer em linha quer não Apenas se se usarem técnicas de varrimento total ou, com técnicas que não registem a totalidade do espectro de massa, se se usarem pelo menos três (grupo B) ou 4 (grupo A) pontos de identificação
LC ou GC com detecção por espectrometria IV	Grupos A e B	Devem cumprir-se os requisitos específicos aplicáveis à absorção na espectrometria IV
LC-DAD de varrimento total	Grupo B	Devem cumprir-se os requisitos específicos aplicáveis à absorção na espectrometria UV
LC-fluorescência	Grupo B	Apenas para moléculas que exibam fluorescência inata e moléculas com fluorescência após transformação ou derivação
2D-TLC-UV/VIS de varrimento total	Grupo B	A cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC) bidimensional e a co-cromatografia são obrigatórias
GC-Detecção por captura de electrões	Grupo B	Apenas se se usarem duas colunas com polaridades diferentes
LC-imunograma	Grupo B	Apenas se se usarem, pelo menos, dois sistemas cromatográficos diferentes ou um segundo método de detecção independente
LC-UV/VIS (comprimento de onda único)	Grupo B	Apenas se se usarem, pelo menos, dois sistemas cromatográficos diferentes ou um segundo método de detecção independente

2.3.1. Critérios de desempenho e requisitos comuns

Os métodos de confirmação devem fornecer informações relativamente à estrutura química da substância a analisar. No caso de vários compostos originarem uma resposta idêntica, então o método não permite a distinção entre esses compostos. Os métodos que utilizam apenas a análise cromatográfica, sem recurso a um sistema de detecção baseado na espectrometria, não são adequados para utilização isolada enquanto métodos de confirmação.

No caso de o método recorrer à utilização de um padrão interno apropriado, este deve ser adicionado à toma de ensaio no início do processo de extração. Em função da disponibilidade, usar-se-ão quer formas estáveis isotopicamente marcadas da substância a analisar, particularmente adequadas para a detecção por espectrometria de massa, quer compostos que apresentem uma relação estrutural com a substância a analisar.

Quando não se puder usar nenhum padrão interno adequado, a identificação da substância deve ser confirmada através de co-cromatografia. Neste último caso, deve obter-se apenas um pico, cujo incremento na altura (ou área) deverá ser equivalente à quantidade de substância a analisar adicionada. No caso da cromatografia gasosa (GC) ou da cromatografia líquida (LC), a largura do pico a metade da sua altura máxima deverá estar compreendida entre 90 % e 110 % da largura inicial, e os tempos de retenção deverão ser idênticos, com um desvio de 5 %. Para métodos baseados em cromatografia em camada fina (TLC), apenas a mancha presumivelmente devida à substância a analisar deve sofrer uma intensificação; não deve observar-se o aparecimento de uma nova mancha e o aspecto visual da mesma não deve sofrer alterações.

Os materiais de referência ou fortificados que contenham quantidades conhecidas da substância a analisar, nas concentrações do limite permitido ou do limite de decisão ou em concentrações próximas (amostra não conforme de controlo), bem como os materiais conformes de controlo e os reagentes para os ensaios em branco devem, de preferência, ser utilizados através de todo o processo em simultâneo com cada lote de amostras analisadas. A ordem de injeção dos extractos no aparelho para análise é a seguinte: reagente para o ensaio em branco, amostra conforme de controlo, amostra(s) a confirmar, novamente amostra conforme de controlo e, finalmente, amostra não conforme de controlo. Qualquer alteração a esta sequência deverá ser justificada.

2.3.2. Critérios de desempenho e outros requisitos adicionais aplicáveis aos métodos de análise quantitativos

2.3.2.1. Veracidade dos métodos quantitativos

No caso de análises repetidas de um material de referência certificado, os intervalos indicativos para os desvios entre o valor médio da fracção mássica corrigido pela recuperação determinado experimentalmente e o valor certificado são os seguintes:

Quadro 2

Veracidade mínima dos métodos quantitativos

Fracção mássica	Intervalo
≤ 1 µg/kg	- 50 % a + 20 %
> 1 µg/kg a 10 µg/kg	- 30 % a + 10 %
≤ 10 µg/kg	- 20 % a + 10 %

Quando estes MRC não estiverem disponíveis, aceita-se que a veracidade das medições seja avaliada através da recuperação de quantidades conhecidas da ou das substâncias a analisar adicionadas a uma matriz em branco. Os dados corrigidos com a média da recuperação só são aceitáveis se se inserirem nos intervalos constantes do quadro 2.

2.3.2.2. Precisão dos métodos quantitativos

O coeficiente de variação interlaboratorial (CV) para as análises repetidas de um material de referência ou de um material fortificado, em condições de reprodutibilidade, não devem exceder o nível calculado através da equação de Horwitz. A equação é a seguinte:

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

em que C é a fracção mássica expressa sob a forma de uma potência de 10 (por exemplo, 1 mg/g = 10⁻³). No quadro 3 apresentam-se alguns exemplos.

Quadro 3

Exemplos de CV de reprodutibilidade para métodos quantitativos referentes a um intervalo de fracções mássicas da substância a analisar

Fracção mássica	CV de reprodutibilidade (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Para fracções mássicas inferiores a 100 µg/kg, a aplicação da equação de Horwitz resulta em valores inaceitavelmente elevados. Por conseguinte, os CV relativos a concentrações inferiores a 100 µg/kg devem ser o mais baixos possível.

No que respeita às análises levadas a cabo em condições de repetibilidade, o CV intralaboratorial deve tipicamente situar-se entre metade e dois terços dos valores supra-referidos. Para análises efectuadas em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o CV intralaboratorial não deve ser superior ao CV de reprodutibilidade.

No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, o método deve alcançar uma reprodutibilidade intralaboratorial não superior ao CV de reprodutibilidade correspondente a uma concentração de 0,5 × limite permitido.

2.3.3. Critérios de desempenho e outros requisitos aplicáveis à detecção por espectrometria de massa

Os métodos de espectrometria de massa são adequados para serem adoptados como métodos de confirmação apenas se usados após uma separação cromatográfica, quer em linha quer não.

2.3.3.1. Separação cromatográfica

Para os procedimentos de GC-MS, a separação por cromatografia gasosa deve ser efectuada utilizando colunas capilares. Para os procedimentos de LC-MS, a separação cromatográfica deve ser efectuada utilizando colunas para LC adequadas. Em qualquer dos casos, o tempo de retenção mínimo aceitável para a substância a analisar deve ser o dobro do tempo de retenção correspondente ao volume morto da coluna. O tempo de retenção (ou tempo de retenção relativo) da substância a analisar na toma de ensaio deve estar em sintonia com o do padrão de calibração dentro dum intervalo especificado de tempos de retenção. O intervalo de tempos de retenção deve ser da ordem de grandeza da capacidade de resolução do sistema cromatográfico. A razão entre os tempos de retenção cromatográficos da substância a analisar e do padrão interno, isto é, o tempo de retenção relativo da substância a analisar, deve corresponder ao da solução de calibração com uma tolerância de $\pm 0,5\%$ para a GC e $\pm 2,5\%$ para a LC.

2.3.3.2. Detecção por espectrometria de massa

A detecção por espectrometria de massa deve ser levada a efeito com a utilização de técnicas de MS tais como o registo de espectros de massa totais (varrimento total) ou a monitorização selectiva de iões (SIM) bem como técnicas MS-MSⁿ tais como a monitorização selectiva de reacções (SRM) ou outras técnicas adequadas de MS ou MS-MSⁿ combinadas como modos adequados de ionização. Na espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), a resolução deve tipicamente ser superior a 10 000 para todo o intervalo mássico a 10 % do vale.

Varrimento total: Quando a determinação por espectrometria de massa for efectuada através do registo de espectros de varrimento total, é obrigatória a presença, no espectro de referência do padrão de calibração, de todos os iões de diagnóstico medidos (ião molecular, aductos característicos do ião molecular, iões fragmentados característicos e iões isótopos) com intensidades relativas superiores a 10 %.

SIM: Quando a determinação por espectrometria de massa for efectuada por fragmentografia, o ião molecular deve, de preferência, ser um dos iões de diagnóstico seleccionados (ião molecular, aductos característicos do ião molecular, iões fragmentados característicos bem como todos os seus iões isótopos). Os iões de diagnóstico seleccionados não devem ter exclusivamente origem na mesma zona da molécula. A razão sinal/ruído para cada ião de diagnóstico deve ser $\geq 3:1$.

Varrimento total e SIM: As intensidades relativas dos iões detectados, expressas como percentagem da intensidade do ião ou da transição mais intensos, devem corresponder às do padrão de calibração, quer se trate de soluções de padrão de calibração quer de amostras fortificadas, em concentrações comparáveis, medidas nas mesmas condições, com as tolerâncias seguintes:

Quadro 4

Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de iões com diversas técnicas de espectrometria de massa

Intensidade relativa (% do pico de base)	EI-GC-MS (relativa)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relativa)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 % – 50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 % – 20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

Interpretação dos dados do espectro de massa: As intensidades relativas dos iões de diagnóstico e/ou de pares de iões precursor/produto devem ser identificadas através da comparação de espectros ou pela integração dos sinais de riscas de massa unitária. Sempre que se aplicarem correcções de fundo, devem fazer-se uniformemente em todo o lote (ver quarto parágrafo do ponto 2.3.1) e indicar-se claramente.

Varrimento total: Sempre que os espectros de varrimento total forem registados em espectrometria de massa simples, devem encontrar-se presentes, no mínimo, quatro iões com intensidades relativas $\geq 10\%$ do pico de base. O ião molecular deve ser incluído se se encontrar presente no espectro de referência com uma intensidade relativa $\geq 10\%$. Pelo menos quatro iões devem situar-se dentro das tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas de iões (quadro 5). Pode utilizar-se a pesquisa de dados de referência assistida por computador. Neste caso, a comparação dos dados do espectro de massa das amostras para ensaio com os da solução de calibração tem de exceder um factor crítico de concordância. Este factor deve ser determinado durante o processo de validação para cada substância a analisar com base nos espectros para os quais se cumpram os critérios descritos *infra*. Deve verificar-se a variabilidade dos espectros causada pela matriz da amostra e pelo desempenho do detector.

SIM: Sempre que os fragmentos forem medidos com outra técnica que não a do varrimento total, deve usar-se um sistema de pontos de identificação para interpretar os dados. Para a confirmação das substâncias enumeradas no grupo A do anexo I da Directiva 96/23/CE, é necessário um mínimo de quatro pontos de identificação. Para a confirmação das substâncias enumeradas no grupo B do anexo I da Directiva 96/23/CE, é necessário um mínimo de três pontos de identificação. No quadro *infra* mostra-se o número de pontos de identificação que cada uma das técnicas básicas de espectrometria de massa pode proporcionar. Contudo, para receber os pontos de identificação exigidos para a confirmação e para calcular o total dos pontos de identificação:

- Deve medir-se um mínimo de, pelo menos, uma razão entre iões; e
- Todas as razões entre iões relevantes medidas devem satisfazer os critérios descritos *supra*; e
- Pode combinar-se um máximo de três técnicas diferentes para atingir o número mínimo de pontos de identificação.

Quadro 5

Relação entre uma série de classes de fragmentos mássicos e os pontos de identificação obtidos

Técnica de MS	Pontos de identificação obtidos por ião
Espectrometria de massa de baixa resolução (LR)	1,0
LR-MS ⁿ ião precursor	1,0
LR-MS ⁿ produtos de transição	1,5
HRMS	2,0
HR- MS ⁿ ião precursor	2,0
HR-MS ⁿ produtos de transição	2,5

Notas:

- Cada ião só pode ser contabilizado uma vez.
- A GC-MS com a utilização da ionização por impacto electrónico é considerada uma técnica diferente da GC-MS com ionização química.
- Podem usar-se substâncias a analisar diferentes para aumentar o número de pontos de identificação unicamente se os derivados resultarem de reacções com mecanismos diferentes.
- Em relação às substâncias do grupo A do anexo I da Directiva 96/23/CE, se as seguintes técnicas forem usadas no procedimento analítico: HPLC associada a espectrofotometria de varrimento total com detecção por um sistema de díodos (DAD); ou HPLC associada a detecção por fluorescência; ou HPLC associada a um imunograma; ou TLC bidimensional associada à detecção espectrométrica; pode atribuir-se um ponto de identificação, no máximo, desde que estejam satisfeitos os critérios relevantes para estas técnicas.
- Nos produtos de transição estão incluídos os produtos de segunda e de terceira geração.

Quadro 6

Exemplos do número de pontos de identificação obtidos por diversas técnicas e suas combinações (n = inteiro)

Técnica(s)	Número de iões	Pontos de identificação
GC-MS (EI ou CI)	N	n
GC-MS (EI e CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI ou CI) 2 derivados	2 (derivado A) + 2 (derivado B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 precursor e 2 de segunda geração	4
LC-MS-MS	1 precursor e 2 de segunda geração	4
GC-MS-MS	2 iões precursores, com 1 ião de segunda geração cada	5
LC-MS-MS	2 iões precursores, com 1 ião de segunda geração cada	5
LC-MS-MS-MS	1 precursor, 1 de segunda geração e 2 de terceira geração	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS e LC-MS	2 + 2	4
GC-MS e HRMS	2 + 1	4

2.3.4. Critérios de desempenho e outros requisitos aplicáveis à cromatografia associada à detecção por infravermelhos

Picos adequados: Os picos adequados correspondem a máximos de absorção no espectro de infravermelhos de um padrão de calibração que satisfaçam os requisitos enumerados a seguir.

2.3.4.1. Detecção por infravermelhos

Máximo de absorção: Deve situar-se na gama de números de onda 4000-500 cm^{-1} .

Intensidade de absorção: Não deve ser inferior a:

- Uma absorvância molar específica de 40 relativamente à linha de base do pico; ou
- Uma absorvância relativa de 12,5 % da absorvância do pico mais intenso na região 4000-500 cm^{-1} ,

quando ambas são medidas relativamente à absorvância zero, e 5 % da absorvância do pico mais intenso na região 4000-500 cm^{-1} , no caso de ambas as medições se efectuarem relativamente à linha de base dos seus picos.

Nota: Embora, do ponto de vista teórico, sejam preferíveis os picos adequados descritos na alínea a), os picos referidos na alínea b) são mais fáceis de determinar na prática.

Deve determinar-se o número de picos do espectro de infravermelhos da substância a analisar cujas frequências correspondem a um pico adequado no espectro do padrão de calibração, com uma margem de $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

2.3.4.2. Interpretação dos dados do espectro de infravermelhos

Deve observar-se absorção em todas as regiões do espectro da substância a analisar que correspondam a um pico adequado no espectro de referência do padrão de calibração. No espectro de infravermelhos do padrão de calibração é necessária a presença de, pelo menos, seis picos adequados. No caso de se encontrarem presentes menos de seis picos adequados (7), o espectro em causa não pode ser utilizado como espectro de referência. O «resultado», isto é, a percentagem de picos adequados presentes no espectro de infravermelhos da substância a analisar, deve ser de, pelo menos, 50. Quando não existir uma correspondência exacta para um pico adequado, a região em causa do espectro da substância a analisar deve ser consistente com a presença de um pico correspondente. O processo descrito é aplicável apenas a picos de absorção no espectro da amostra com uma intensidade de, pelo menos, três vezes o ruído entre picos.

2.3.5. Critérios de desempenho e outros requisitos aplicáveis à determinação de uma substância utilizando LC em conjunto com outras técnicas de detecção

2.3.5.1. Separação cromatográfica

No caso de se encontrar disponível um material adequado para tal efeito, deve usar-se um padrão interno. Deverá tratar-se, de preferência, de um padrão correlacionado com um tempo de retenção próximo do da substância a analisar. A substância a analisar deve ser eluída no tempo de retenção característico do padrão de calibração correspondente, nas mesmas condições experimentais. O tempo de retenção mínimo aceitável para uma substância a analisar deve ser duas vezes o tempo de retenção do volume morto da coluna. A razão entre o tempo de retenção da substância a analisar e o do padrão interno, isto é, o tempo de retenção relativo da substância a analisar, deve ser idêntico ao do padrão de calibração na matriz adequada, com uma margem de $\pm 2,5 \%$.

2.3.5.2. Detecção por UV/VIS de varrimento total

Devem ser satisfeitos os critérios de desempenho para os métodos de LC.

Os máximos de absorção no espectro da substância a analisar devem ocorrer aos mesmos comprimentos de onda que os do padrão de calibração, com uma margem determinada pela resolução do sistema de detecção. No caso de detecção com sistema de díodos, a margem em causa é, em geral, de $\pm 2 \text{ nm}$. Acima de 220 nm, o aspecto visual do espectro da substância a analisar não deve diferir do espectro do padrão de calibração nas zonas dos dois espectros com uma absorvância relativa $\geq 10 \%$. Este critério é satisfeito quando, por um lado, se encontram presentes os mesmos máximos e, por outro, quando em nenhum dos pontos observados a diferença entre os dois espectros excede 10 % da absorvância do padrão de calibração. Caso se utilize a pesquisa e a concordância de dados de referência assistidas por computador, a comparação dos dados do espectro das amostras para ensaio com os da solução de calibração deve exceder um factor crítico de concordância. Este factor deve ser determinado durante o processo de validação para cada substância a analisar com base nos espectros para os quais se cumpram os critérios descritos *supra*. Deve verificar-se a variabilidade dos espectros causada pela matriz da amostra e pelo desempenho do detector.

2.3.5.3. Critérios de desempenho para a detecção fluorimétrica

Devem ser satisfeitos os critérios de desempenho para os métodos de LC.

Este método aplica-se a moléculas que exibam fluorescência inata bem como a moléculas com fluorescência após transformação ou derivação. A selecção dos comprimentos de onda de excitação e de emissão combinada com as condições cromatográficas deve ser feita de forma a minimizar a ocorrência de componentes interferentes em extractos da amostra em branco.

O valor máximo do pico mais próximo no cromatograma deve encontrar-se separado do pico correspondente à substância a analisar por uma distância igual a, pelo menos, a largura total do pico da substância a analisar a 10 % da sua altura máxima.

2.3.5.4. Critérios de desempenho para a determinação de uma substância a analisar por LC-imunograma

A técnica de LC-imunograma não é adequada para utilização isolada enquanto método de confirmação.

Devem ser satisfeitos os critérios relevantes para os métodos de LC.

Os parâmetros pré-definidos relativos ao controlo de qualidade, por exemplo, a ligação não específica, a ligação relativa das amostras de controlo ou o valor da absorvância do branco, devem situar-se nos limites obtidos durante a validação do ensaio.

O imunograma deve ser constituído por, no mínimo, cinco fracções.

Cada fracção deve ser inferior a metade da largura do pico.

A fracção com o teor máximo em substância a analisar deve ser a mesma para a amostra suspeita, para a amostra não conforme de controlo e para o padrão.

2.3.5.5. Determinação de uma substância a analisar por LC com detecção por UV/VIS (comprimento de onda único)

A técnica de LC com detecção por UV/VIS (comprimento de onda único) não é adequada para utilização isolada enquanto método de confirmação.

O valor máximo do pico mais próximo no cromatograma deve encontrar-se separado do pico correspondente à substância a analisar por uma distância igual a, pelo menos, a largura total do pico da substância a analisar a 10 % da sua altura máxima.

2.3.6. Critérios de desempenho e outros requisitos aplicáveis à determinação de uma substância por 2-D TLC associada a uma detecção por espectrometria de UV/VIS de varrimento total

A cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC) bidimensional e a co-cromatografia são obrigatórias.

Os valores de R_f da substância a analisar devem corresponder aos valores de R_f dos padrões com um limite de $\pm 5\%$.

O aspecto visual da substância a analisar não deve ser distinto do aspecto visual da substância padrão.

Para manchas da mesma cor, a distância entre o centro da mancha referente à substância a analisar e o da mancha mais próxima deve ser, pelo menos, metade da soma dos diâmetros das manchas.

O aspecto visual do espectro da substância a analisar não deve diferir do aspecto visual do espectro do padrão, tal como descrito no respeitante à detecção por UV/VIS de varrimento total.

Caso se utilize a pesquisa e a concordância de dados de referência assistidas por computador, a comparação dos dados do espectro das amostras para ensaio com os da solução de calibração deve exceder um factor crítico de concordância. Este factor deve ser determinado durante o processo de validação para cada substância a analisar com base nos espectros para os quais se cumpram os critérios descritos *supra*. Deve verificar-se a variabilidade dos espectros causada pela matriz da amostra e pelo desempenho do detector.

2.3.7. Critérios de desempenho e outros requisitos aplicáveis à determinação de uma substância a analisar por GC combinada com detecção por captura de electrões (ECD)

No caso de se encontrar disponível um material adequado para tal efeito, deve usar-se um padrão interno. Deverá tratar-se, de preferência, de uma substância correlacionada com um tempo de retenção próximo do da substância a analisar. A substância a analisar deve ser eluída no tempo de retenção característico do padrão de calibração correspondente, nas mesmas condições experimentais. O tempo de retenção mínimo aceitável para uma substância a analisar deve ser duas vezes o tempo de retenção do volume morto da coluna. A razão entre o tempo de retenção da substância a analisar e o do padrão interno, isto é, o tempo de retenção relativo da substância a analisar, deve ser idêntico ao do padrão de calibração na matriz adequada, com uma margem de $\pm 0,5\%$. O valor máximo do pico mais próximo no cromatograma deve encontrar-se separado do pico correspondente à substância a analisar por uma distância igual a, pelo menos, a largura total do pico da substância a analisar a 10 % da sua altura máxima. Pode usar-se a co-cromatografia para obter informação adicional.

2.4. MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO APLICÁVEIS AOS ELEMENTOS

As análises para a confirmação dos elementos químicos devem basear-se no conceito da identificação inequívoca e da quantificação exacta e rigorosa através das propriedades físico-químicas próprias do elemento químico em causa (por exemplo, comprimento de onda característico da radiação emitida ou absorvida pelo elemento, massa atómica) ao nível requerido.

Os seguintes métodos ou combinações de métodos são considerados adequados para a identificação de elementos químicos:

Quadro 7

Métodos de confirmação adequados para elementos químicos

Técnica	Parâmetro medido
Voltametria de redissolução anódica de impulsos diferenciais	Sinal eléctrico
Espectrometria de absorção atómica	
Chama	Comprimento de onda de absorção
Formação de hidretos	Comprimento de onda de absorção
Vapor frio	Comprimento de onda de absorção
Atomização electrotérmica (câmara de grafite)	Comprimento de onda de absorção
Espectrometria de emissão atómica	
Plasma indutivo	Comprimento de onda de emissão
Espectrometria de massa	
Plasma indutivo	Razão massa/carga

2.4.1. Critérios de desempenho e outros requisitos comuns aplicáveis aos métodos de confirmação

Os materiais de referência ou fortificados que contenham quantidades conhecidas da substância a analisar, nas concentrações do limite máximo permitido ou do limite de decisão ou em concentrações próximas (amostra não conforme de controlo), bem como os materiais conformes de controlo e os reagentes para os ensaios em branco devem, de preferência, ser utilizados através de todo o processo em simultâneo com cada lote de amostras analisadas. A ordem de injeção recomendada dos extractos no aparelho para análise é a seguinte: reagente para o ensaio em branco, amostra conforme de controlo, amostra a confirmar, amostra conforme de controlo e, finalmente, amostra não conforme de controlo. Qualquer alteração a esta sequência deverá ser justificada.

De um modo geral, a maioria das técnicas analíticas exigem a digestão completa da matriz orgânica para a obtenção de soluções, antes da determinação da substância a analisar. Este processo pode ser levado a cabo através da mineralização por micro-ondas, que minimiza o risco de perda e/ou contaminação das substâncias a analisar. Devem utilizar-se recipientes em Teflon descontaminados e de boa qualidade. Caso se recorra a outros métodos de digestão húmida ou seca, devem estar disponíveis as provas documentais que excluam potenciais perdas ou fenómenos de contaminação. Como alternativa à digestão, pode, em determinadas circunstâncias, escolher-se processos de separação (por exemplo, a extracção) para separar as substâncias a analisar dos componentes da matriz e/ou concentrá-las para a sua introdução nos aparelhos de análise.

No que respeita à calibração, quer seja externa quer baseada no método da adição de padrão, deve prestar-se atenção em não exceder o intervalo de trabalho estabelecido para a análise. Em caso de calibração externa, é obrigatório preparar os padrões de calibração numa solução com composição tão semelhante quanto possível à da solução da amostra. As correcções de fundo devem também ser aplicadas se tal for exigido pelas condições específicas da análise.

2.4.2. Critérios de desempenho e outros requisitos adicionais aplicáveis aos métodos de análise quantitativos

2.4.2.1. Veracidade dos métodos quantitativos

No caso de análises repetidas de um material de referência certificado para elementos, o desvio entre o teor médio determinado experimentalmente e o valor certificado não deve ultrapassar o limite de $\pm 10\%$. Quando estes MRC não estiverem disponíveis, aceita-se que a veracidade das medições seja avaliada através da recuperação de quantidades conhecidas do elemento adicionadas às amostras com teor desconhecido. Chama-se a atenção para o facto de que, ao contrário da substância a analisar, o elemento adicionado não se encontra ligado quimicamente à matriz real e, por conseguinte, os resultados obtidos com este método são menos fiáveis que os resultantes da utilização dos MRC. Os dados relativos à recuperação só são aceitáveis se se encontrarem num limite de $\pm 10\%$ do valor-alvo.

2.4.2.2. Precisão dos métodos quantitativos

No caso de análises repetidas de uma amostra em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação (CV) intralaboratorial da média não deve exceder os seguintes valores:

Quadro 8

CV para métodos quantitativos referentes a um intervalo de fracções mássicas do elemento

Fracção mássica	CV (%)
≥ 10 µg/kg a 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg a 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3. Requisitos específicos para a voltametria de redissolução anódica de impulsos diferenciais (DPASV)

A destruição completa da matéria orgânica nas amostras antes das determinações por DPASV é extremamente importante. Os voltamogramas não devem apresentar sinais largos causados pela presença de materiais orgânicos. Os constituintes inorgânicos da matriz podem influenciar a altura dos picos em DPASV. Por conseguinte, a quantificação deve ser efectuada através do método da adição de padrão. Juntamente com o método, devem ser fornecidos modelos de voltamogramas típicos de uma solução de amostra.

2.4.4. Requisitos específicos para a espectrometria de absorção atómica (AAS)

Esta técnica é basicamente mono-elemento e, por conseguinte, exige a optimização das condições experimentais em função do elemento específico a quantificar. Sempre que possível, os resultados devem ser verificados do ponto de vista quantitativo e qualitativo recorrendo a riscas de absorção alternativas (idealmente, devem seleccionar-se duas riscas diferentes). Os padrões de calibração devem ser preparados numa solução cuja matriz corresponda tanto quanto possível à da solução de amostra a medir (por exemplo, no que respeita à concentração de ácido ou à composição). Para minimizar os valores obtidos no ensaio em branco, todos os reagentes devem ter o mais elevado grau de pureza disponível. Dependendo do modo escolhido para vaporizar e/ou atomizar a amostra, distinguem-se diversos tipos de AAS.

2.4.4.1. Requisitos específicos para a AAS de chama

Para cada elemento, deve optimizar-se a regulação da aparelhagem. Em especial, devem verificar-se a composição e o caudal do gás. Para evitar interferências causadas pela absorção de fundo deve usar-se uma fonte correctora contínua. No caso de se usarem matrizes desconhecidas, deve verificar-se se é necessária a correcção de fundo.

2.4.4.2. Requisitos específicos para a AAS com câmara de grafite

Ao trabalhar com níveis ultravestigiais na câmara de grafite, a exactidão é frequentemente afectada pela contaminação no laboratório. Por conseguinte, devem usar-se reagentes de elevado grau de pureza, água desionizada e recipientes em plástico inerte para a manipulação de amostras e padrões. Para cada elemento, deve optimizar-se a regulação da aparelhagem. Em especial, devem verificar-se as condições de pré-tratamento e de atomização (temperatura, tempo) e as alterações da matriz.

O trabalho em condições de atomização isotérmicas (por exemplo, tubo transversal em grafite aquecido com uma plataforma L'vov integrada) (8) reduz a influência da matriz na atomização da substância a analisar. É permitida a quantificação através de uma curva de calibração baseada em medições de soluções padrão aquosas quando combinada com a modificação da matriz e com a correcção de fundo de Zeeman (9).

2.4.5. Requisitos específicos para a espectrometria de absorção atómica com formação de hidretos

Os compostos orgânicos que contêm elementos tais como arsénio, bismuto, germânio, chumbo, antimónio, selénio, estanho e telúrio podem ser muito estáveis e exigem uma decomposição oxidativa para obter resultados correctos relativos ao teor total do elemento. Por conseguinte, recomenda-se a digestão por micro-ondas ou a incineração a altas pressões em meio fortemente oxidante. Deve prestar-se grande cuidado à conversão completa e reprodutível dos elementos nos respectivos hidretos.

A formação de hidreto de arsénio em solução de ácido clorídrico com NaBH₄ depende do estado de oxidação do arsénio (As III: formação rápida, As V: período de formação mais longo). Para evitar uma perda de sensibilidade na determinação do As V com a técnica de injeção de fluxo, devido ao curto tempo de reacção neste sistema, o As V tem que ser reduzido a As III após a decomposição oxidativa. São adequados para este efeito o iodeto de potássio/ácido ascórbico ou a cisteína. As soluções para ensaio em branco, soluções de calibração e soluções de amostra devem sofrer o mesmo tratamento. O trabalho num sistema descontínuo permite a determinação de ambas as espécies de arsénio sem afectar a exactidão. Devido à formação retardada do hidreto de As V, a calibração deve ser efectuada através da integração da área dos picos. Deve optimizar-se a regulação da aparelhagem. O caudal do gás que transfere o hidreto para o atomizador é particularmente importante e deve ser verificado.

2.4.6. Requisitos específicos para a espectrometria de absorção atómica com vapor frio

O vapor frio é utilizado apenas no caso de mercúrio. É necessário um especial cuidado durante a realização de toda a análise devido à volatilização e às perdas por adsorção de mercúrio elementar. Deve evitar-se cuidadosamente a contaminação pelos reagentes ou pelo ambiente.

Os compostos orgânicos que contêm mercúrio necessitam de uma decomposição oxidativa para obter resultados correctos para o teor total em mercúrio. Para a decomposição, devem usar-se sistemas selados com digestão por micro-ondas ou um incinerador de alta pressão. É necessário um cuidado especial na limpeza do equipamento que esteve em contacto com o mercúrio.

O trabalho com a técnica de injeção de fluxo é vantajoso. Para limites de decisão mais baixos, recomenda-se a adsorção do mercúrio elementar no adsorvente de ouro/platina seguido de dessorção térmica. Devem evitar-se os contactos entre o adsorvente ou a célula com humidade já que perturbam a medição.

2.4.7. Requisitos específicos para a espectrometria de emissão atómica com plasma indutivo (ICP-AES)

A espectrometria de emissão atómica com plasma indutivo (10) é um método de multi-elementos, permitindo a medição simultânea de vários elementos. Para utilizar a ICP-AES, as amostras têm que ser primeiramente digeridas para decompor as matrizes orgânicas. Devem usar-se sistemas selados com digestão por micro-ondas ou a incineração a altas pressões. Para uma análise válida por ICP-AES, a calibração de instrumento e a selecção do elemento ou do comprimento de onda desempenham um papel essencial. Para a calibração da aparelhagem, no caso de curvas de calibração lineares, é geralmente apenas necessário medir soluções de calibração com quatro concentrações, uma vez que as curvas de calibração de ICP-AES são geralmente lineares ao longo de quatro a seis ordens de grandeza da concentração. A calibração do sistema ICP-AES deveria normalmente ser efectuada com um padrão de multielementos, que deve ser preparado numa solução que contenha a mesma concentração em ácido que a solução de medição. Em relação à curva linear, devem verificar-se as concentrações dos elementos.

Para a medição da emissão das substâncias a analisar, devem seleccionar-se os comprimentos de onda adequados para as concentrações dos elementos a determinar. Quando a concentração da substância a analisar se encontrar fora do intervalo de trabalho de uma risca de emissão, deve utilizar-se uma risca diferente. De início, escolhe-se a risca de emissão mais sensível (sem interferência), a seguir selecciona-se uma risca menos sensível. Quando se trabalha no limite de detecção ou perto dele, a melhor escolha é geralmente a risca mais sensível para a correspondente substância a analisar. As interferências espectrais e de fundo são as que causam as maiores dificuldades em ICP-AES. As interferências possíveis são, por exemplo, deslocamento de fundo simples, deslocamento de fundo com declive, sobreposição espectral directa e deslocamento de fundo complexo. Cada uma destas interferências tem causas e soluções próprias. Dependendo das matrizes, devem aplicar-se as correcções das interferências e a optimização dos parâmetros de funcionamento. Algumas interferências podem ser evitadas através da diluição ou da adaptação das matrizes. Para cada lote de amostras para ensaio analisadas, o material de referência e fortificado contendo quantidades conhecidas da ou das substâncias a analisar assim como o material para o ensaio em branco devem sofrer o mesmo tratamento que as amostras para ensaio. Para testar possíveis desvios, o padrão deve ser verificado, por exemplo, após 10 amostras. Todos os reagentes, assim como o gás plasma, devem ter o mais elevado grau de pureza disponível.

2.4.8. Requisitos específicos para a espectrometria de massa com plasma indutivo (ICP-MS)(11)

A determinação de elementos vestigiais de massa atómica média, como o crómio, o cobre e o níquel pode ser objecto de forte interferência por parte de outros iões isobáricos e poliatómicos. Este inconveniente só pode ser remediado se se dispuser de uma capacidade de resolução de, pelo menos, 7000-8000. As dificuldades associadas às técnicas de MS incluem os desvios instrumentais, os efeitos da matriz e interferência de iões moleculares ($m/z < 80$). São necessários padrões internos múltiplos abrangendo o mesmo intervalo mássico que os elementos a determinar para corrigir os desvios instrumentais e os efeitos da matriz.

É necessária a decomposição completa da matéria orgânica nas amostras antes das medições por ICP-MS. Tal como no caso da AAS, após a digestão em recipientes fechados, os elementos voláteis, tais como o iodo, devem ser transferidos para um estado de oxidação estável. As interferências mais problemáticas resultam das combinações de iões moleculares de argon (gás plasma), hidrogénio, carbono, azoto e oxigénio (ácidos de dissolução, impurezas do gás plasma e gases atmosféricos arrastados) com a matriz da amostra. Para evitar interferências, é necessário uma digestão completa, as medições de fundo, a selecção adequada das massas analíticas, por vezes associadas a uma abundância reduzida (limite de detecção mais baixo) e dos ácidos de dissolução, por exemplo, ácido nítrico.

Para os elementos a determinar, as interferências devem ser excluídas pela adequada escolha das massas analíticas específicas, incluindo a confirmação das relações isotópicas. Deve verificar-se a resposta instrumental para cada medição mediante a utilização dos padrões internos e tendo em conta os factores de Fano.

3. VALIDAÇÃO

A validação deve demonstrar que o método analítico dá cumprimento aos critérios aplicáveis às características relevantes do desempenho.

Diferentes objectivos de controlo exigem diferentes categorias de métodos. O quadro seguinte determina qual a característica do desempenho a verificar para cada tipo de método.

Quadro 9

Classificação dos métodos analíticos com as características do desempenho que devem ser determinadas

		Limite de detecção CCB	Limite de decisão CC α	Veracidade/Recuperação	Precisão	Selectividade/Especificidade	Aplicabilidade/Robustez/Estabilidade
Métodos qualitativos	T	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Métodos quantitativos	T	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = Métodos de triagem; C = Métodos de confirmação; + = A determinação é obrigatória

3.1. PROCEDIMENTOS DE VALIDAÇÃO

O presente capítulo fornece exemplos e/ou referências para os procedimentos de validação dos métodos analíticos. Podem usar-se outras abordagens para demonstrar que o método analítico cumpre os critérios e as características de desempenho, desde que alcancem o mesmo nível e qualidade de informação.

A validação pode também ser efectuada através da realização de um estudo interlaboratorial tal como estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, pela ISO ou pela IUPAC (12) ou segundo métodos alternativos como os estudos unilaboratoriais ou a validação interna (13) (14). O presente capítulo centra-se nos estudos unilaboratoriais (validação interna) utilizando uma abordagem *modular*. Esta abordagem consiste em:

1. Um conjunto de características de desempenho comuns, independentes do modelo de validação utilizado; e
2. Procedimentos mais específicos dependentes do modelo, tal como descritos no quadro 10.

Quadro 10

Parâmetros de desempenho independentes e dependentes do modelo

Validação		
Parâmetros de desempenho independentes do modelo	Parâmetros de desempenho dependentes do modelo	
Características de desempenho comuns (3.1.1)	Abordagem convencional da validação (3.1.2)	Abordagem da validação interna (3.1.3)
Especificidade	Recuperação	Recuperação
Veracidade	Repetibilidade	Repetibilidade
Robustez: pequenas alterações	Reprodutibilidade intralaboratorial	Reprodutibilidade intralaboratorial
Estabilidade	Reprodutibilidade	Reprodutibilidade
	Limite de decisão (CC α)	Limite de decisão (CC α)
	Capacidade de detecção (CC β)	Capacidade de detecção (CC β)
	Curvas de calibração	Curvas de calibração
	Robustez: grandes alterações	Robustez

3.1.1. Parâmetros de desempenho independentes do modelo

Independentemente da abordagem de validação seleccionada, devem determinar-se as características de desempenho mencionadas a seguir. Para minimizar a carga de trabalho, pode utilizar-se uma abordagem cuidadosamente projectada e consistente estatisticamente para combinar as experiências executadas para determinar diferentes parâmetros.

3.1.1.1. Especificidade

Para os métodos analíticos, é importante a capacidade de discriminação entre a substância a analisar e substâncias aparentadas (isómeros, metabolitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, etc.). Para verificar as interferências, são necessárias duas abordagens.

Por conseguinte, devem seleccionar-se as substâncias potencialmente interferentes e as amostras para ensaios em branco relevantes devem ser analisadas para detectar a presença de possíveis interferentes e para estimar o efeito das interferências.

- Seleccionar uma gama de compostos quimicamente aparentados (metabolitos, derivados, etc.) ou outras substâncias susceptíveis de serem encontradas com o composto em causa e que possam estar presentes nas amostras.
- Analisar um número adequado de amostras em branco representativas ($n \geq 20$) e verificar as possíveis interferências (sinais, picos, vestígios iónicos) na zona em que se prevê a eluição da substância a analisar.
- Adicionalmente, devem fortificar-se amostras em branco representativas numa concentração relevante com substâncias que possam interferir na identificação e/ou na quantificação da substância a analisar.
- Após a análise, investigar se:
 - a presença pode conduzir a uma falsa identificação,
 - a identificação da substância a analisar é impedida pela presença de um ou vários interferentes, ou
 - a quantificação é apreciavelmente influenciada.

3.1.1.2. Veracidade

No presente ponto, descreve-se a determinação da veracidade (um dos componentes da exactidão). A veracidade só pode ser estabelecida através de um material de referência certificado (MRC). Deve usar-se um MRC sempre que esteja disponível. O procedimento encontra-se detalhadamente descrito na norma ISO 5725-4 (5). É apresentado um exemplo a seguir.

- Analisar seis amostras idênticas do MRC em conformidade com as instruções para o método.
- Determinar a concentração da substância a analisar presente em cada uma daquelas amostras.
- Calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) para estas concentrações.
- Calcular a veracidade dividindo a concentração média detectada pelo valor certificado (medido como concentração) e multiplicando por 100, para exprimir o resultado sob a forma de uma percentagem.

Veracidade (%) = concentração média detectada corrigida pela recuperação \times 100/valor certificado.

Se não estiver disponível nenhum MRC, em vez da veracidade, a recuperação pode ser determinada da forma indicada no ponto 4.1.2.1 *infra*.

3.1.1.3. Aplicabilidade/robustez (pequenas alterações)

Estes estudos utilizam a introdução deliberada pelo laboratório de pequenas variações razoáveis e a observação das suas consequências.

Devem ser efectuados estudos prévios para a selecção de factores do pré-tratamento, da limpeza e da análise da amostra, susceptíveis de influenciarem os resultados da medição. Estes factores podem incluir o analista, a fonte e a idade dos reagentes, solventes, padrões e extractos de amostra, a taxa de aquecimento, a temperatura, o pH assim como muitos outros factores que se podem verificar no laboratório. Estes factores devem ser alterados numa ordem de grandeza coerente com os desvios geralmente encontrados entre laboratórios.

- Identificar possíveis factores que possam influenciar os resultados.
- Variar levemente cada factor.

- Realizar um teste de robustez utilizando a abordagem de Youden (15) (16). (Nesta fase, podem usar-se outros métodos aprovados. Contudo, a abordagem de Youden minimiza o tempo e o esforço exigidos). A abordagem de Youden é de concepção factorial fraccionária. Não se podem detectar as interacções entre os diversos factores.
- Quando se verificar que um factor influencia significativamente os resultados das medições, devem fazer-se mais experiências para decidir quanto aos limites de aceitabilidade deste factor.
- Os factores que influenciam significativamente os resultados devem ser claramente identificados no protocolo do método.

A ideia de base não é o estudo de uma alteração de cada vez mas sim a introdução de diversas variações ao mesmo tempo. A título de exemplo, sejam A, B, C, D, E, F, G os valores nominais de sete factores diferentes susceptíveis de influenciarem os resultados quando os seus valores forem alterados ligeiramente. Sejam os seus valores alternativos designados pelas mesmas letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g. Daqui resultam 2⁷ ou 128 combinações possíveis.

É possível escolher um subconjunto de oito destas combinações com uma relação equilibrada entre maiúsculas e minúsculas (quadro 11). Devem fazer-se oito determinações, com uma combinação dos factores escolhidos (A-G). Os resultados das determinações são apresentados no quadro 11 *infra* como S-Z.

Quadro 11

Concepção de experiência para os estudos de robustez (pequenas alterações)

Valor do factor F	Combinação de determinações n.º							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	B	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado observado R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Para os cálculos, ver exemplos de testes à robustez no ponto 3.3.

3.1.1.4. Estabilidade

Observou-se que a insuficiente estabilidade da substância a analisar ou dos constituintes da matriz durante o armazenamento ou a análise podem dar origem a desvios significativos no resultado da análise. Além disso, deve verificar-se a estabilidade do padrão de calibração em solução. Geralmente, a estabilidade da substância a analisar está bem caracterizada em várias condições de armazenamento. A monitorização das condições de armazenamento faz parte do sistema normal de acreditação do laboratório. Para os casos em que a estabilidade não for conhecida, dão-se seguidamente exemplos sobre a forma de a determinar.

Estabilidade da substância a analisar em solução

- Preparar uma solução-mãe fresca da ou das substâncias a analisar e diluir tal com especificado nas instruções da análise de modo a poder preparar alíquotas suficientes (por exemplo, 40) de cada concentração seleccionada (em redor do limite mínimo de desempenho requerido no que respeita a substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido em redor do limite permitido para outras substâncias). Preparar soluções da substância a analisar usada para a fortificação com padrão e para a solução final de análise, bem como qualquer outra solução com interesse (por exemplo, padrões derivados).
- Medir o teor da substância a analisar na solução recentemente preparada de acordo com as instruções da análise.
- Colocar volumes adequados em recipientes apropriados, rotular e armazenar de acordo com o plano seguinte:

Quadro 12

Plano para a determinação da estabilidade de uma substância a analisar em solução

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Escuro	10 alíquotas	10 alíquotas	10 alíquotas
Luz			10 alíquotas

- O tempo de armazenamento pode ser seleccionado como 1, 2, 3 e 4 semanas ou maior, caso necessário, por exemplo, até ao primeiro fenómeno de degradação observável durante a identificação e/ou a quantificação. Devem registar-se o tempo de armazenamento máximo e as condições de armazenamento óptimas.
- O cálculo da concentração da ou das substâncias a analisar em cada alíquota deve ser efectuado considerando como 100 % a solução dessa substância recentemente preparada aquando da análise.

$$\text{Substância a analisar restante (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{fresca}}$$

C_i = concentração no momento i

C_{fresca} = concentração da solução fresca

Estabilidade da ou das substâncias a analisar na matriz

- Sempre que possível, devem usar-se amostras reais. Quando isso não for possível, deve usar-se a matriz fortificada com a substância a analisar.
- Se estiver disponível material real para amostra, a sua concentração deve ser determinada enquanto o material ainda está fresco. Após 1, 2, 4 e 20 semanas podem tomar-se mais alíquotas do material e determinar as respectivas concentrações. Os tecidos devem ser armazenados a um mínimo de - 20 °C ou inferior caso necessário.
- Caso não se encontrar disponível material real para amostra, deve tomar-se algum material em branco e homogeneizá-lo. O material deve ser dividido em cinco alíquotas. Cada alíquota deve ser fortificada com a substância a analisar, preparada de preferência numa pequena quantidade de solução aquosa. Uma alíquota deve ser analisada imediatamente. As restantes devem ser armazenadas a um mínimo de - 20 °C ou inferior, caso necessário, e analisadas após 1, 2, 4 e 20 semanas.

3.1.1.5. Curvas de calibração

Quando as curvas de calibração são usadas para quantificação:

- Na construção da curva devem usar-se, pelo menos, cinco níveis (incluindo o zero).
- Deve descrever-se o intervalo de trabalho da curva de calibração.
- Deve indicar-se a equação da curva e o grau de ajuste dos dados à curva.
- Devem mencionar-se os intervalos de aceitabilidade dos parâmetros da curva.

Sempre que seja necessária uma calibração em série baseada numa solução padrão, devem indicar-se intervalos aceitáveis para os parâmetros da curva de calibração, os quais podem variar em cada série.

3.1.2. Procedimentos convencionais de validação

O cálculo dos parâmetros de acordo com os métodos convencionais exige a realização de diversas experiências isoladas. Cada característica do desempenho deve ser determinada para cada alteração importante (ver *supra* o ponto consagrado à aplicabilidade/robustez). No que respeita aos métodos multi-substâncias, podem analisar-se várias substâncias em simultâneo, desde que se tenham previamente excluído possíveis interferências relevantes. De modo semelhante, podem determinar-se diversas características do desempenho. Por conseguinte, para minimizar a carga de trabalho, aconselha-se, tanto quanto possível, combinar as experiências (por exemplo, a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratorial com a especificidade, a análise das amostras em branco para determinar o limite de decisão e controlar a especificidade).

3.1.2.1. Recuperação

Caso não exista um MRC disponível, a recuperação deve ser determinada através de experiências com uma matriz em branco fortificada, usando, por exemplo, o esquema seguinte:

- seleccionar 18 alíquotas de um material em branco e fortificar três grupos de seis alíquotas com 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido ou com 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite permitido,
- analisar as amostras e calcular a concentração presente em cada amostra,

- utilizando a equação referida abaixo, calcular a recuperação para cada amostra,
- calcular a recuperação média e o CV dos seis resultados de cada nível,
- % Recuperação = $100 \times \text{teor medido/nível de fortificação}$.

Este método convencional para a determinação da recuperação é uma variante do método da adição de padrão descrito em 3.5, em que:

- a amostra é considerada como uma amostra em branco em vez duma amostra a analisar,
- consideram-se o rendimento ⁽¹⁾ e a recuperação ⁽²⁾ semelhantes para as duas tomas de ensaio,
- as amostras para ensaio têm a mesma massa e os extractos para tomas de ensaio o mesmo volume,
- a quantidade de padrão de calibração adicionada à segunda toma de ensaio (fortificada) designa-se por x_{ADD} ($x_{\text{ADD}} = \rho_A \cdot V_A$),
- x_1 é o valor medido para o branco e x_2 o valor medido para a segunda toma de ensaio (fortificada).
- Então: % Recuperação = $100 (x_2 - x_1)/x_{\text{ADD}}$.

Sempre que alguma das condições *supra*-referidas não estiver satisfeita (ou se julgar não satisfeita), então deve realizar-se o procedimento completo para a determinação da recuperação através do método da adição de padrão tal como descrito no ponto 3.5.

3.1.2.2. Repetibilidade

- Preparar um conjunto de amostras com matrizes idênticas, fortificadas com a substância a analisar de modo a obter concentrações equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido ou a 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite permitido.
- Para cada nível, a análise deve ser realizada com, pelo menos, seis réplicas.
- Analisar as amostras.
- Calcular a concentração detectada para cada amostra.
- Calcular a concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas.
- Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes.
- Calcular a concentração média global e os CV para as amostras fortificadas.

3.1.2.3. Reprodutibilidade intralaboratorial

- Preparar um conjunto de amostras de materiais de ensaio especificados (com matrizes idênticas ou diferentes), fortificadas com a ou as substâncias a analisar de modo a obter concentrações equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido ou a 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite permitido.
- Para cada nível, a análise deve ser realizada com, pelo menos, seis réplicas.
- Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes com operadores diferentes e condições ambientais diferentes, por exemplo, lotes diferentes de reagentes, solventes, etc., temperatura ambiente diferente, instrumentação diferente, etc., se possível.
- Analisar as amostras.
- Calcular a concentração detectada para cada amostra.
- Calcular a concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas.

3.1.2.4. Reprodutibilidade

Sempre que se tiver que verificar a reprodutibilidade, os laboratórios devem participar em estudos colaborativos de acordo com a norma ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5. Limite de decisão (CCa)

O limite de decisão deve ser estabelecido de acordo com os requisitos de identificação ou de identificação e quantificação tal como definidos nos «Critérios de desempenho e outros requisitos aplicáveis aos métodos analíticos» (parte 2).

⁽¹⁾ Rendimento: a fracção mássica da substância a analisar contida na amostra que se encontra presente no extracto final.

⁽²⁾ Recuperação (neste caso): a fracção mássica da substância a analisar adicionada à amostra que se encontra presente no extracto final. No resto do documento, assume-se que o rendimento e a recuperação são iguais e, por conseguinte, usa-se apenas o termo «recuperação».

Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido, o CC α pode ser estabelecido:

- quer através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843 (17) (aqui referido como o valor líquido crítico da variável). Neste caso, deve usar-se material em branco, fortificado no nível mínimo de desempenho requerido e acima desse nível em passos equidistantes. Analisar as amostras. Após a identificação, representar graficamente o sinal em função da concentração adicionada. O limite de decisão é igual à concentração correspondente à ordenada na origem mais 2,33 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. Este método aplica-se apenas a ensaios quantitativos ($\alpha = 1\%$).
- quer analisando pelo menos 20 materiais em branco por matriz de modo a poder calcular a razão sinal/ruído no intervalo de tempo em que se espera obter a substância a analisar. Pode usar-se como limite de decisão três vezes a razão sinal/ruído. Este método é aplicável tanto a ensaios quantitativos como qualitativos.

Em caso de substâncias com um limite permitido definido, o CC α pode ser estabelecido:

- quer através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843 (17) (aqui referido como o valor líquido crítico da variável). Neste caso, deve usar-se material em branco, fortificado em redor do limite permitido em passos equidistantes. Analisar as amostras. Após a identificação, representar graficamente o sinal em função da concentração adicionada. O limite de decisão ($\alpha = 5\%$) é igual à concentração correspondente ao limite permitido mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial,
- quer analisando pelo menos 20 materiais em branco por matriz fortificados com a ou as substâncias a analisar no limite permitido. O limite de decisão ($\alpha = 5\%$) é igual à concentração ao limite permitido mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão.

Ver também o artigo 5.º e o ponto 3.2.

3.1.2.6. Capacidade de detecção (CC β)

A capacidade de detecção deve ser determinada de acordo com os requisitos de triagem, de identificação ou de identificação e quantificação tal como definidos (ver parte 2).

Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido, o CC β pode ser estabelecido:

- quer através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843 (17) (aqui referido como o valor líquido mínimo detectável da variável). Neste caso, deve usar-se material em branco representativo, fortificado ao nível mínimo de desempenho requerido e abaixo desse nível em passos equidistantes. Analisar as amostras. Após a identificação, representar graficamente o sinal em função da concentração adicionada. A capacidade de detecção ($\beta = 5\%$) é igual à concentração correspondente ao limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial do teor médio medido no limite de decisão,
- quer analisando pelo menos 20 materiais em branco por matriz fortificados com a ou as substâncias a analisar no limite de decisão. Analisar as amostras e identificar as substâncias. A capacidade de detecção ($\beta = 5\%$) é igual ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial do teor medido,
- quando não estiverem disponíveis resultados quantitativos, a capacidade de detecção pode ser determinada através da investigação de material em branco fortificado no limite de decisão e acima desse limite. Neste caso, o nível de concentração no qual apenas se obtém $\leq 5\%$ de falsos resultados conformes é igual à capacidade de detecção do método. Por conseguinte, devem realizar-se, pelo menos, 20 investigações para, pelo menos, um nível de concentração de modo a garantir uma base sustentável para esta determinação.

Em caso de substâncias relativamente às quais se encontre definido um limite permitido, o CC β pode ser estabelecido:

- quer através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843 (17) (aqui referido como o valor líquido mínimo detectável da variável). Neste caso, deve usar-se material em branco representativo, fortificado em redor do limite permitido em passos equidistantes. Analisar as amostras e identificar a ou as substâncias. Calcular o desvio padrão do teor médio medido no limite de decisão. A capacidade de detecção ($\beta = 5\%$) é igual à concentração correspondente ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial,
- quer analisando pelo menos 20 materiais em branco por matriz fortificados com a ou as substâncias a analisar no limite de decisão. A capacidade de detecção ($\beta = 5\%$) é igual ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão.

Ver também ponto 3.2.

3.1.2.7. Robustez (grandes alterações)

O método analítico deve ser testado em diferentes condições experimentais que incluem, por exemplo, espécies diferentes, matrizes diferentes ou condições de amostragem diferentes. As alterações introduzidas devem ser importantes. A importância destas alterações pode ser avaliada, por exemplo, utilizando a abordagem de Youden (15) (16). Deve determinar-se cada característica do desempenho relativamente a todas as grandes alterações que tenham comprovadamente um efeito significativo sobre o desempenho do ensaio.

3.1.3. Validação de acordo com modelos alternativos

Sempre que se aplicarem procedimentos de validação alternativos, devem ser estabelecidos no protocolo de validação o modelo e a estratégia subjacentes, juntamente com os respectivos pré-requisitos, pressupostos e fórmulas ou, pelo menos, devem ser fornecidas referências quanto à sua disponibilidade. É apresentado a seguir um exemplo de uma abordagem alternativa. Quando se aplica, por exemplo, o modelo de validação interna, determinam-se as características do desempenho de forma a permitir a validação das grandes alterações no âmbito do mesmo procedimento de validação. Para o efeito, é necessário conceber um plano experimental para a validação.

3.1.3.1. Plano experimental

Deve ser concebido um plano experimental em função do número de espécies e factores diferentes que estão a ser investigados. Assim, a primeira fase de todo o procedimento de validação deve ter em conta as populações de amostras que, no futuro, serão analisadas no laboratório, a fim de seleccionar as espécies mais importantes e os factores que possam influenciar os resultados das medições. Posteriormente, deve seleccionar-se a gama de concentrações de uma forma adaptada aos objectivos e de acordo com o nível requerido.

Exemplo:

- Podem investigar-se simultaneamente várias substâncias a analisar utilizando o método analítico que está a ser validado.
- Foram identificadas duas variações do factor principal (A e B). Os factores principais constituem a base em que se combinam os níveis dos factores. Entre estes factores principais podem incluir-se factores como a espécie ou a matriz. Neste exemplo, o factor principal apresentou variações a dois níveis, ou seja, foram consideradas duas espécies diferentes (espécies A e B). Regra geral, é possível fazer variar os factores principais a mais de dois níveis, o que só vai aumentar o número de análises a realizar.
- Os factores seleccionados devem ser objecto de variação a dois níveis (indicados quer como + quer como -).

Quadro 13

Exemplos de factores considerados importantes para um procedimento de validação

Sexo do animal	(factor 1)
Raça	(factor 2)
Condições de transporte	(factor 3)
Condições de armazenamento	(factor 4)
Frescura da amostra	(factor 5)
Condições de engorda	(factor 6)
Operadores diferentes com experiência diferente	(factor 7)

Quadro 14

Plano experimental possível para o exemplo supra

Espécie	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Amostra n.º
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Espécie	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Amostra n.º
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Uma vez que cada amostra (cada combinação de níveis de factores) deve ser fortificada com quatro concentrações diferentes em torno do nível requerido e deve ser analisada uma amostra em branco para cada nível, terão de ser realizadas $5 \times 16 = 80$ análises para toda a experiência de validação.

Destes 80 resultados de medições, é possível calcular (13) (14):

Recuperação

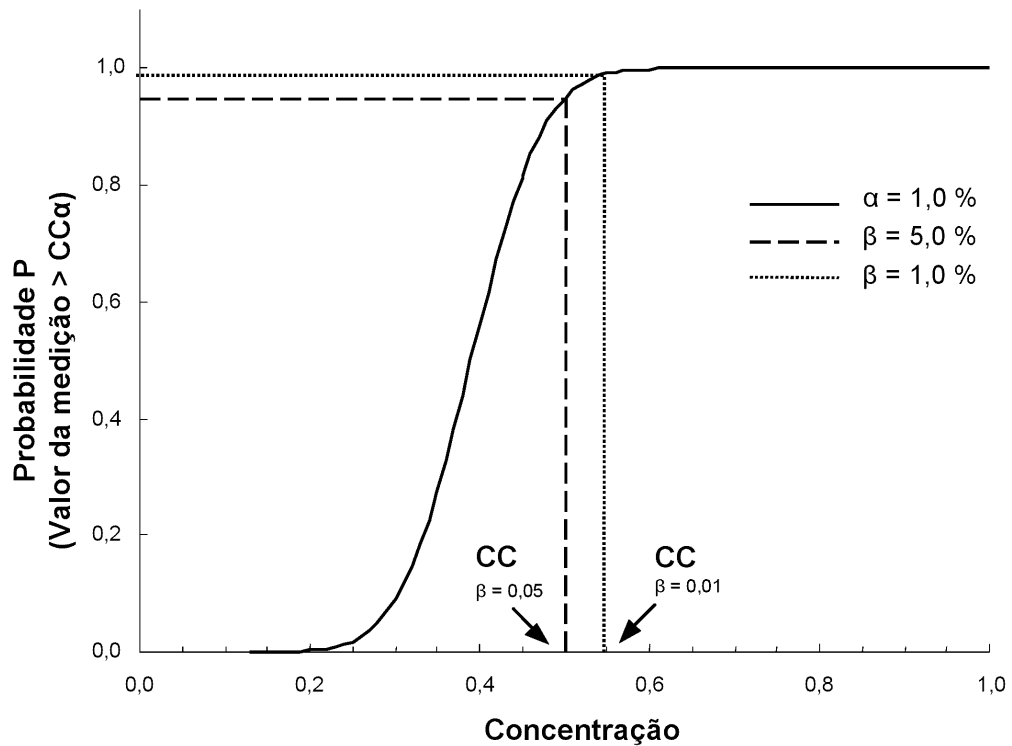
- Repetibilidade por nível de concentração (s_{pr});
- Reprodutibilidade intralaboratorial por nível de concentração (s_{IR});
- Limite de decisão (CC α);
- Capacidade de detecção (CC β);
- Curva de potências (taxa de erro β em função da concentração — ver ponto 3.1.3.2);
- Robustez a grandes alterações; a robustez a pequenas alterações pode determinar-se de acordo com o ponto 3.1.1.3;
- 16 curvas de calibração relacionadas com as amostras;
- 1 curva de calibração global;
- Intervalo de previsão da curva de calibração global;
- Desvios induzidos pela matriz (s_{mat});
- Desvios induzidos pelo processo da análise (s_{num});
- Efeitos dos factores isolados nos resultados das medições.

Estas características do desempenho permitem a avaliação detalhada do nível de desempenho do método, uma vez que não só se investiga a influência dos factores isoladamente mas também as combinações relevantes desses factores. Com o auxílio desta concepção de experiência, é possível decidir se se deve excluir da curva de calibração global algum dos factores seleccionados, porque se desvia significativamente do desvio padrão dos outros factores.

3.1.3.2. Curva de potências

A curva de potências proporciona informações sobre a capacidade de detecção do método na gama de concentrações seleccionada. Refere-se ao risco de erro β na aplicação do método investigado. A curva de potências permite o cálculo das capacidades de detecção para as respectivas categorias (triagem, confirmação) ou tipos (qualitativo ou quantitativo) de métodos para um determinado erro β (por exemplo, 5 %).

Figura 1:
Curva de potências



A figura 1 mostra um exemplo do estabelecimento gráfico da capacidade de detecção ($CC\beta$) de um método analítico. Este método específico apresenta um risco remanescente de tomar uma decisão falsa de 5 % a uma concentração de 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A uma concentração de 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o risco de tomar uma falsa decisão conforme diminui para 1 %.

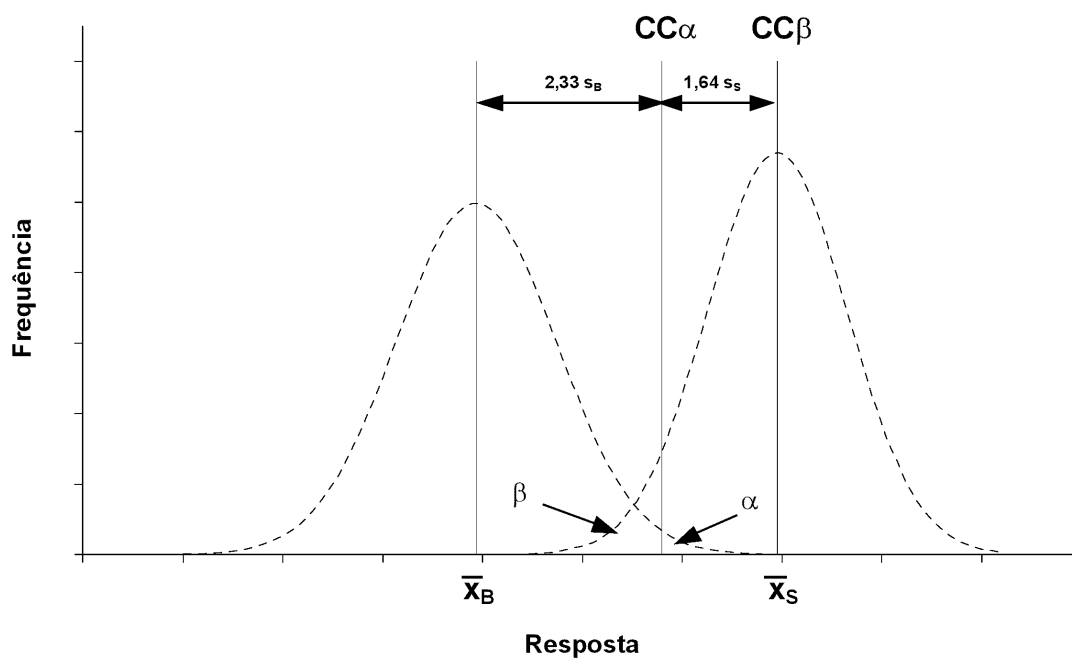
3.1.3.3. Reprodutibilidade

A determinação da reprodutibilidade de um método através do método do estudo unilaboratorial (validação interna) exige a participação repetida em estudos de aptidão, em conformidade com os Guias ISO 43-1 e 43-2 (4). Os laboratórios podem escolher os respectivos métodos, desde que estes sejam utilizados em condições de rotina. O desvio padrão do laboratório pode ser usado para avaliar a reprodutibilidade do método.

3.2. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DIFERENTES LIMITES ANALÍTICOS

Figura 2:

Substâncias para as quais não se encontra definido um limite permitido



\bar{X}_S Valor médio da resposta da amostra contaminada

s_B Desvio padrão da amostra em branco (determinado em condições de reprodutibilidade intralaboratorial)

s_S Desvio padrão da amostra contaminada (determinado em condições de reprodutibilidade intralaboratorial)

α Taxa de falsos resultados não conformes

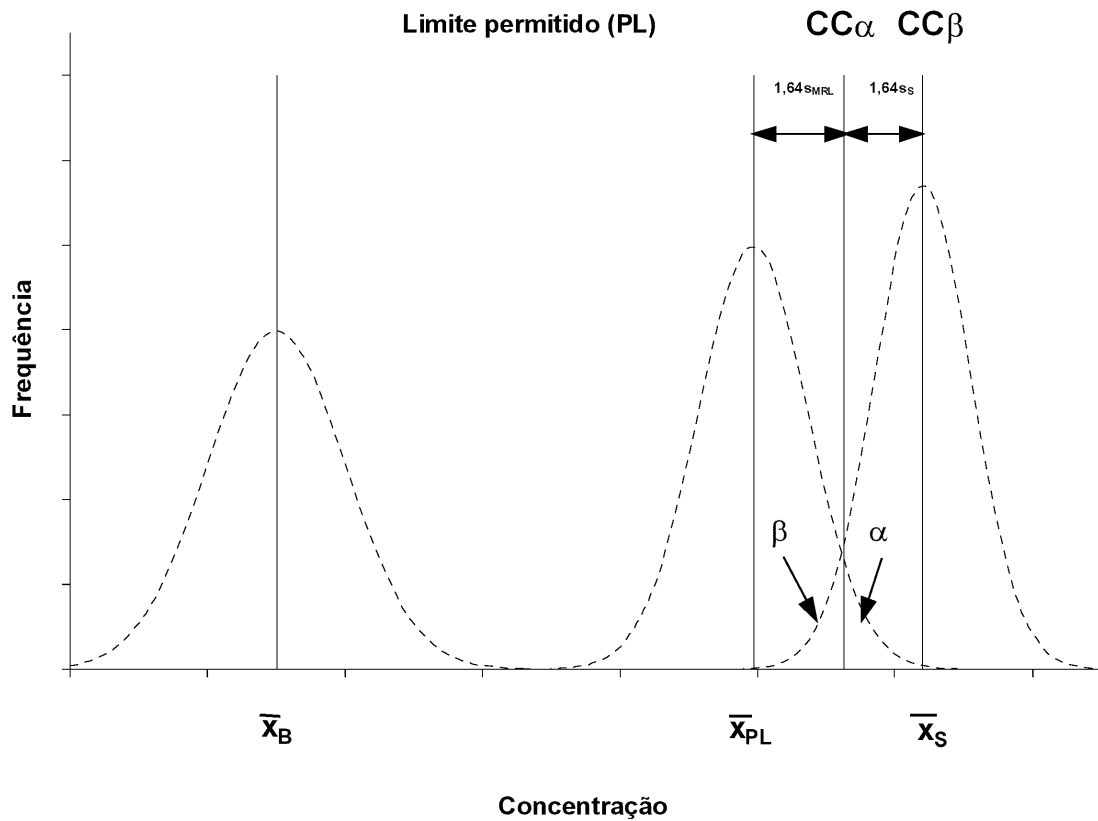
β Taxa de falsos resultados conformes

$CC\alpha$ Resposta com um determinado erro α e 50 % de erro β

$CC\beta$ Resposta com um erro α muito reduzido e um determinado erro β

Figura 3:

Substâncias para as quais se encontra definido um limite permitido



- \bar{x}_B «Concentração» média da amostra em branco
- \bar{x}_{PL} Concentração média da amostra contendo a substância a analisar no limite permitido
- \bar{x}_S Concentração média da amostra contaminada
- s_{PL} Desvio padrão da amostra contendo a substância a analisar no limite permitido (determinado em condições de reprodutibilidade intralaboratorial)
- s_S Desvio padrão da amostra contaminada (determinado em condições de reprodutibilidade intralaboratorial)
- α Taxa de falsos resultados não conformes
- β Taxa de falsos resultados conformes
- CC_α Resposta com um determinado erro α e 50 % de erro β
- CC_β Resposta com um erro α muito reduzido e um determinado erro β

3.3. EXEMPLO DE CÁLCULO PARA UM TESTE À ROBUSTEZ A PEQUENAS ALTERAÇÕES DE ACORDO COM A ABORDAGEM DE YOUDEN (16)

Comparação das médias (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Comparar as médias das letras maiúsculas (A_A a A_C) com as médias das minúsculas correspondentes (A_a a A_g). Se um factor tiver influência, a diferença será significativamente maior que as diferenças dos outros factores.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	Um método robusto não deve ser afectado por alterações encontradas quase de certeza entre laboratórios.
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	Caso não se verifiquem diferenças dignas de nota, a medida mais realista do erro aleatório é dada pelas sete diferenças.
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Diferenças (D_i)	Quadrados das diferenças (D_i^2)
$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$	$D_a^2 = \text{valor a}$
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$	$D_b^2 = \text{valor b}$
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$	$D_c^2 = \text{valor c}$
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$	$D_d^2 = \text{valor d}$
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$	$D_e^2 = \text{valor e}$
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$	$D_f^2 = \text{valor f}$
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$	$D_g^2 = \text{valor g}$

Desvio padrão das diferenças D_i (s_{D_i}):

$$S_{D_i} = \sqrt{2 * \Sigma(D_i^2 / 7)}$$

Sempre que o s_{D_i} for significativamente maior que o desvio padrão do método realizado em condições de reprodutibilidade intralaboratorial (ver *supra*) pode deduzir-se que o conjunto dos factores tem influência no resultado, mesmo que cada factor isoladamente não influencie significativamente, e que o método não é suficientemente robusto face às alterações escolhidas.

3.4. EXEMPLOS DE CÁLCULOS PARA O PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO INTERNA

Exemplos e cálculos para o protocolo de validação interna tal como descritos no ponto consagrado à validação de acordo com modelos alternativos (ponto 3.1.3) (13) (14).

3.5. EXEMPLOS DE CÁLCULO PARA O MÉTODO DA ADIÇÃO DE PADRÃO

Divide-se uma amostra para ensaio com teor T na substância a analisar em duas tomas de ensaio 1 e 2 com massas m_1 e m_2 . A toma de ensaio 2 é fortificada com um volume V_A de uma solução da substância a analisar com concentração ρ_A . Após as etapas de extracção e purificação do método obtêm-se dois extractos das tomas de ensaio com volumes V_1 e V_2 . Assume-se a recuperação da substância a analisar como rc. Ambos os extractos são analisados com um método de medição com sensibilidade b dando, respectivamente, respostas analíticas de x_1 e x_2 .

Se se considerar que rc e b são os mesmos para a substância a analisar nas amostras nativa e fortificada, então o teor T pode ser calculado como:

$$T = x_1 \cdot V_1 \cdot \rho_A \cdot V_A / (x_2 \cdot V_2 \cdot m_1 - x_1 \cdot V_1 \cdot m_2)$$

O método permite a determinação da recuperação rc. Para esse efeito, adicionalmente ao ensaio descrito *supra*, parte do extracto da toma de ensaio 1 (volume V_3) é fortificado com uma quantidade conhecida $\rho_B \cdot V_B$ da substância a analisar, fazendo o respectivo ensaio. Sendo a resposta analítica x_3 , a recuperação é:

$$rc = x_2 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot \rho_B \cdot V_B / [x_3 \cdot V_1 \cdot V_3 (T \cdot m_2 + \rho_A \cdot V_A) - x_2 \cdot V_2 \cdot T \cdot m_1 (V_3 \cdot V_B)]$$

Além disso, é ainda possível calcular a sensibilidade b, como:

$$b = x_1 \cdot V_1 / rc \cdot T \cdot m_1$$

Encontram-se descritos todos os pormenores e as condições de aplicação (18).

4. ABREVIATURAS UTILIZADAS

AAS	Espectrometria de absorção atómica (Atomic Absorption Spectrometry)
AES	Espectrometria de emissão atómica (Atomic Emission Spectrometry)
AOAC-I	Associação dos Químicos Analíticos Oficiais Internacional (Association of Official Analytical Chemists International)
B	Fracção ligada (imunoensaios)
CI	Ionização química (Chemical ionisation)
MRC	Material de referência certificado
CV	Coefficiente de variação
2-D	Bidimensional
DAD	Detecção com sistema de díodos (Diode array detection)
DPASV	Voltametria de redissolução anódica de impulsos diferenciais
ECD	Detecção por captura de electrões (Electron Capture Detection)
EI	Ionização por impacto electrónico (Electronic Impact Ionisation)
GC	Cromatografia gasosa (Gas Chromatography)
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução (High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	Cromatografia em camada fina de alta resolução (High Performance Thin Layer Chromatography)
HRMS	(Espectrometria de massa) de alta resolução (High Resolution Mass Spectrometry)
ICP-AES	Espectrometria de emissão atómica com plasma indutivo (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivo (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
IV	Infravermelho
ISO	Organização Internacional de Normalização (International Standard Organisation)
LC	Cromatografia líquida (Liquid Chromatography)
LR(MS)	(Espectrometria de massa) de baixa resolução [Low Resolution (Mass Spectrometry)]
LMDR	Limite mínimo de desempenho requerido
MS	Espectrometria de massa (Mass Spectrometry)
m/z	Razão massa/carga
R _f	Migração relativa à frente de solvente (cromatografia em camada fina)
DPRL	Desvio padrão relativo do laboratório
SIM	Monitorização selectiva de iões (Selected Ion Monitoring)
TLC	Cromatografia em camada fina (Thin Layer Chromatography)
UV	Luz ultravioleta
VIS	Luz visível

5. REFERÊNCIAS

- (1) ISO 17025:1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories
- (2) ISO 3534-1:1993 Statistical Methods for quality control — Vol. 1 vocabulary and symbols
- (3) ISO Guide 43-1:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes
- (4) ISO Guide 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies
- (5) ISO 5725:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions; ISO 5725-2 Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a *standard* measurement method; Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a *standard* measurement method

- (6) ISO 78-2:1999 Chemistry — Layouts for standards — Part 2: Methods of chemical analysis
 - (7) W.G de Ruig and J.M Weseman «A new approach to confirmation by infrared spectrometry» *J. Chemometrics* 4 (1990) 61-77
 - (8) See e.g. May, T.W., Brumbaugh, W.G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: *Analytical Chemistry* 54(7):1032-1037 (90353)
 - (9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, pp. xxvi + 675
 - (10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992
 - (11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, pp. 329
 - (12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Applied Chem*, 67, 331
 - (13) Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 120, 173
 - (14) Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr.*, 716, 221
 - (15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA
 - (16) W.J. Youden; Steiner, E.H.; «Statistical Manual of the AOAC—Association of Official Analytical Chemists», AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 ff
 - (17) ISO 11843:1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case
 - (18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: «Yield or recovery: a world of difference». Proceedings 8th Euro Food Chem, Vienna, Austria September 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, page 2-9
 - (19) Directiva 71/354/CEE do Conselho, de 18 de Outubro de 1971, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes às unidades de medida (JO L 243 de 29.10.1971, p. 29)
 - (20) ISO 31-0:1992 Quantities and units — Part 0: General principles
-