

**REGULAMENTO (UE) N.º 278/2012 DA COMISSÃO****de 28 de março de 2012****que altera o Regulamento (CE) n.º 152/2009 no que respeita à determinação dos teores de dioxinas e de bifenilos policlorados****(Texto relevante para efeitos do EEE)**

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 11.º, n.º 4,

Considerando o seguinte:

- (1) A Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de maio de 2002, relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais <sup>(2)</sup> estabelece limites máximos para a presença de dioxinas, furanos e bifenilos policlorados (PCB) em alimentos para animais, bem como limiares de intervenção que induzem os Estados-Membros a proceder a análises a fim de identificar a origem dessas substâncias.
- (2) O Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão, de 27 de janeiro de 2009, que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais <sup>(3)</sup> inclui métodos para a determinação dos teores de dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF) e de bifenilos policlorados (PCB) sob a forma de dioxina em alimentos para animais.
- (3) Pode utilizar-se um método de análise de pré-seleção com validação amplamente aceitável e com rendimento elevado para identificar as amostras com teores significativos de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina (de preferência, selecionando amostras que excedam os limiares de intervenção e garantam a seleção de amostras que excedam os limites máximos). Os teores de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nestas amostras têm de ser determinados por um método de análise de confirmação. Por conseguinte, é conveniente estabelecer requisitos adequados para o método de pré-seleção que garanta que a taxa de falsos resultados conformes relativamente a limi-

tes máximos é inferior a 5 %, bem como requisitos rigorosos para os métodos de análise de confirmação. Além disso, os métodos de confirmação permitem a determinação de teores também na gama baixa dos níveis de contaminação de base. Este aspeto é importante para acompanhar as tendências temporais, a avaliação da exposição e para reavaliar os limites máximos e os limiares de intervenção.

- (4) A alteração dos limites máximos de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina e o estabelecimento de PCB não semelhantes a dioxinas na Diretiva 2002/32/CE, bem como a necessidade de atualizar os critérios dos métodos de pré-seleção obrigam a modificar as regras aplicáveis à determinação de dioxinas e PCB nos alimentos para animais, tal como previsto no anexo V, parte B, do Regulamento (CE) n.º 152/2009. Por questões de clareza e inteligibilidade, convém substituir a parte B do anexo V.
- (5) É da maior importância que os resultados analíticos sejam comunicados e interpretados de maneira uniforme, a fim de assegurar uma abordagem harmonizada de execução em toda a União.
- (6) O anexo V do Regulamento (CE) n.º 152/2009 deve, portanto, ser alterado em conformidade.
- (7) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal e nem o Parlamento Europeu nem o Conselho se lhes opuseram,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

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

*Artigo 2.º*

O presente regulamento entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*. É aplicável a partir da data de entrada em vigor.

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

Feito em Bruxelas, em 28 de março de 2012.

*Pela Comissão*  
O Presidente  
José Manuel BARROSO

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

<sup>(2)</sup> JO L 140 de 30.5.2002, p. 10.

<sup>(3)</sup> JO L 54 de 26.2.2009, p. 1.

## ANEXO

No anexo V do Regulamento (CE) n.º 152/2009, a parte B, «DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) E DE PCB SOB A FORMA DE DIOXINA PARA EFEITOS DE CONTROLO OFICIAL», passa a ter a seguinte redação:

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

## CAPÍTULO I

**Métodos de amostragem e interpretação de resultados analíticos**1. **Objecto e âmbito de aplicação**

As amostras destinadas ao controlo oficial dos teores de dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF), bifenilos policlorados (PCB) sob a forma de dioxina (\*) e de PCB não semelhantes a dioxinas nos alimentos para animais devem ser colhidas em conformidade com os métodos descritos no anexo I. Devem aplicar-se as exigências quantitativas respeitantes ao controlo de substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos, tal como se prevê no ponto 5.A do anexo I. As amostras globais assim obtidas são consideradas representativas dos lotes ou sublotos dos quais foram colhidas. A observância dos limites máximos estabelecidos na Diretiva 2002/32/CE deve ser estabelecida em função dos teores determinados nas amostras de laboratório.

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

Congénere	Valor do FET	Congénere	Valor do FET
<b>Dibenzo-p-dioxinas («PCDD») e dibenzo-p-furanos («PCDF»)</b>		<b>PCB «sob a forma de dioxina»: PCB não-orto + PCB mono-orto</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB não-orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
		PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

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

Para efeitos da presente parte do anexo V, são aplicáveis as definições estabelecidas no anexo I da Decisão 2002/657/CE da Comissão, de 14 de agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (\*\*).

(\*\*) JO L 221 de 17.8.2002, p. 8.

## 2. Conformidade do lote ou do sublote com a especificação

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

O lote está conforme com a especificação se o resultado analítico não for superior ao limite máximo de PCB não semelhantes a dioxinas estabelecido na Diretiva 2002/32/CE, tomando em consideração a incerteza da medição.

O lote não está conforme com a especificação se o resultado analítico superior (\*\*\*) confirmado por análise em duplicado (\*\*\*\*), for superior ao limite máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE, tomando em consideração a incerteza da medição.

A incerteza da medição deve ser tida em consideração de acordo com uma das seguintes abordagens:

- calculando a incerteza expandida, utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não está conforme se o valor medido menos U for superior ao limite máximo,
- estabelecendo o limite de decisão (CC<sub>a</sub>) em conformidade com o ponto 3.1.2.5 do anexo I da Decisão 2002/657/CE. Um lote ou sublote não está conforme se o valor medido for igual ou superior ao CC<sub>a</sub>.

Estas regras de interpretação são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. No caso de análises para efeitos de direito de recurso ou de procedimentos de arbitragem, são aplicáveis as normas nacionais.

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

(\*\*\*\*) A análise em duplicado é necessária para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca accidental de amostras. A primeira análise, que tem em conta a incerteza da medição, é utilizada para verificar a conformidade. No caso de a análise ser realizada no contexto de um incidente de contaminação, a confirmação através de uma análise em duplicado poderá ser omitida, se as amostras selecionadas para análise estiverem associadas, através da rastreabilidade, a esse incidente de contaminação.

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

O lote está conforme com as especificações se o resultado analítico de uma única análise,

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

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

O lote não está conforme com a especificação se o resultado analítico superior (\*\*\*\*\*), obtido por um método de confirmação e confirmado por análise em duplicado, for superior ao limite máximo estabelecido na Diretiva 2002/32/CE, tomando em consideração a incerteza da medição (\*\*\*\*\*).

A incerteza da medição deve ser tida em consideração de acordo com uma das seguintes abordagens:

- calculando a incerteza expandida, utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não está conforme se o valor medido menos U for superior ao limite máximo. No caso de uma determinação em separado dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, a soma da incerteza expandida estimada dos resultados analíticos separados dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina deve ser utilizada para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina,
- estabelecendo o limite de decisão (CC<sub>a</sub>) em conformidade com o ponto 3.1.2.5 do anexo I da Decisão 2002/657/CE. Um lote ou sublote não está conforme se o valor medido for igual ou superior ao CC<sub>a</sub>.

Estas regras de interpretação são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. No caso de análises para efeitos de direito de recurso ou de procedimentos de arbitragem, são aplicáveis as normas nacionais.

(\*\*\*\*\*) O conceito de «limite superior» exige que se utilize o limite de quantificação para calcular o contributo de cada congénere não quantificado para os equivalentes tóxicos (TEQ). O conceito de «limite inferior» exige que se utilize zero para calcular o contributo de cada congénere não quantificado para os TEQ. O conceito de «limite médio» exige que se utilize metade do limite de quantificação para calcular o contributo de cada congénere não quantificado para os TEQ.

(\*\*\*\*\*\*) A análise em duplicado é necessária para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca acidental de amostras. A primeira análise, que tem em conta a incerteza da medição, é utilizada para verificar a conformidade. No caso de a análise ser realizada no contexto de um incidente de contaminação, a confirmação através de uma análise em duplicado poderá ser omitida, se as amostras selecionadas para análise estiverem associadas, através da rastreabilidade, a esse incidente de contaminação

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

Os limiares de intervenção servem de instrumento para a seleção de amostras nos casos em que é necessário identificar uma fonte de contaminação e adotar medidas com vista à sua redução ou eliminação. Os métodos de pré-seleção devem estabelecer valores-limite adequados para a seleção dessas amostras. Os esforços necessários para identificar a fonte e reduzir ou eliminar a contaminação devem ser envidados apenas se a superação dos limiares de intervenção for confirmada por uma análise em duplicado mediante um método de confirmação e tendo em conta a incerteza da medição (\*\*\*\*\*).

(\*\*\*\*\*\*) Explicação e requisitos aplicáveis à análise em duplicado para o controlo de limiares de intervenção idênticos aos da nota (\*\*\*\*\*) para limites máximos.

## CAPÍTULO II

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

#### 1. Âmbito de aplicação

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

A monitorização da presença de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina nos alimentos para animais pode ser realizada com dois objetivos diferentes:

- Seleção das amostras com teores de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina que excedam os limites máximos, ou os limiares de intervenção. Esta abordagem pode envolver um método de pré-seleção que permita uma boa relação custo-eficácia, aumentando assim a oportunidade de descobrir novos incidentes com elevada exposição e riscos para a saúde dos consumidores. Os métodos de pré-seleção podem incluir métodos bioanalíticos e métodos CG/EM. A sua aplicação deverá ter como objetivo evitar falsos resultados conformes. É necessário que a concentração de PCDD/F e a soma de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas amostras com teores significativos seja determinada/confirmada por um método de confirmação;
- Determinação dos teores de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas amostras de alimentos para animais na gama baixa dos níveis de contaminação de base. Tal é importante para acompanhar as tendências temporais e a avaliação da exposição da população, bem como para criar uma base de dados para uma eventual reavaliação dos níveis de ação e dos limites máximos. Este objetivo é conseguido através de métodos de confirmação, que permitam identificar os PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e quantificá-los inequivocamente ao teor requerido. Estes métodos podem utilizar-se para a confirmação de resultados obtidos por métodos de pré-seleção e para a determinação de níveis de contaminação de base baixos na monitorização dos alimentos para animais. São também importantes para estabelecer padrões de congéneres com vista a identificar a fonte de uma eventual contaminação. Atualmente, tais métodos utilizam a cromatografia gasosa de elevada resolução/espectrometria de massa de elevada resolução (HRGC/HRMS).

#### 2. Classificação dos métodos pelo seu grau de quantificação (\*\*\*\*\*)

(\*\*\*\*\*\*) Adaptada para PCDD/F e compostos sob a forma de dioxina a partir das «Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines» (Orientações para a validação de métodos de pré-seleção de resíduos de medicamentos veterinários), laboratórios de referência da UE (LRUE) para resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes em géneros alimentícios de origem animal em Fougères, Berlim e Bilthoven, 20/1/2010, [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab\\_analysis\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm).

- 2.1. Os métodos qualitativos dão uma resposta de tipo sim/não quanto à presença dos analitos em causa, sem indicação quantificada da concentração do analito requerido. Os métodos qualitativos podem ter o potencial para fornecer resultados semiquantitativos, mas são utilizados apenas para comunicar uma decisão de tipo sim/não como indicação de teores acima ou abaixo de certas gamas, por exemplo, limite de deteção, limite de quantificação ou valores-limite.

Para o controlo dos limites máximos e dos limiares de intervenção referentes aos PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina nos alimentos para animais, podem aplicar-se métodos de pré-seleção baseados na comparação entre o resultado analítico e um valor-limite e que proporcionam uma decisão de tipo sim/não para indicar a eventual superação do teor requerido.

- 2.2. Métodos semiquantitativos são métodos que dão uma indicação aproximada da concentração do analito suposto, embora o resultado numérico não preencha os requisitos para métodos quantitativos. Podem utilizar-se para obter informações sobre a gama de concentrações do analito, a fim de ajudar o analista a decidir da gama de calibração para o teste de confirmação a realizar posteriormente e para efeitos de controlo de qualidade. Consideram-se métodos semiquantitativos, por exemplo, os seguintes métodos:
- a) Métodos que têm por base princípios biológicos, como ensaios com células, ensaios com recetores ou imunoensaios, a seguir designados por métodos bioanalíticos, que são capazes de detetar os analitos requeridos, que incluem uma curva de calibração, que dão uma resposta sim/não para indicar a eventual superação do nível requerido e que permitem notificar o resultado como equivalentes bioanalíticos (BEQ), constituindo uma indicação do valor TEQ na amostra;
  - b) testes físico-químicos [por exemplo, cromatografia gasosa-espetrometria de massa/espetrometria de massa (GC-MS/MS) ou cromatografia gasosa/espetrometria de massa de baixa resolução (GC/LRMS)], em que as características de precisão do método de medição não cumprem os requisitos aplicáveis de testes quantitativos.
- 2.3. Os métodos quantitativos cumprem os mesmos requisitos de exatidão, gama dinâmica e precisão que os métodos de confirmação. Quando for necessário quantificar, validar-se-ão métodos quantitativos como métodos de confirmação.

### 3. Contexto

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

Para efeitos da presente parte B do anexo V, o limite específico aceite de quantificação de um congénere individual é a concentração de um analito no extrato de uma amostra que produza uma resposta instrumental a dois iões diferentes, a qual será controlada com um rácio sinal/ruído (S/R) de 3:1 para o sinal menos intenso e o cumprimento de critérios de identificação descritos, por exemplo, na norma prEN 16215 (Alimentação animal – determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina por CG/HRMS e de PCB indicadores por CG/HRMS) e/ou no método EPA 1613, revisão B.

Os métodos bioanalíticos de pré-seleção não darão resultados ao nível do congénere, mas apenas uma indicação (\*\*\*\*\*) do valor TEQ, expresso em equivalentes bioanalíticos (BEQ) no sentido de reconhecer o facto de que nem todos os compostos presentes num extrato de amostra que produz uma resposta no teste podem cumprir todos os requisitos do princípio TEQ.

Os métodos de pré-seleção e de confirmação apenas podem ser aplicados para o controlo de uma determinada matriz se os métodos forem suficientemente sensíveis para detetar fiavelmente teores ao teor requerido (limiar de intervenção ou limite máximo).

---

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

### 4. Requisitos de garantia da qualidade

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

- 4.3. O armazenamento e o transporte das amostras devem ser realizados de modo a manter a integridade da amostra de alimentos para animais.
- 4.4. Desde que relevante, cada amostra de laboratório deve ser finamente triturada e cuidadosamente misturada, mediante um processo que tenha demonstrado alcançar uma homogeneização completa (por exemplo, trituração que permita passar por um crivo de 1 mm). As amostras devem ser exsiccadas antes da trituração, caso o teor em humidade seja demasiado elevado.
- 4.5. Deve proceder-se ao controlo de reagentes, de material de vidro e de equipamento relativamente a uma eventual influência nos resultados baseados em TEQ ou em BEQ.
- 4.6. Deve ser efetuada uma análise em branco através da realização de todo o procedimento analítico, omitindo apenas a amostra.
- 4.7. Relativamente aos métodos bioanalíticos, devem testar-se todo o material de vidro e os solventes utilizados na análise para verificar se estão isentos de compostos que interfiram com a deteção de compostos-alvo na gama de trabalho. O material de vidro deve ser enxaguado com solventes ou aquecido a temperaturas adequadas para remover da sua superfície vestígios de PCDD/F, de compostos sob a forma de dioxina e de compostos interferentes.
- 4.8. A quantidade da amostra utilizada para a extração deve ser suficiente para cumprir os requisitos relativos a uma gama de trabalho suficientemente baixa, incluindo as concentrações requeridas.
- 4.9. Os procedimentos específicos para preparação de amostras utilizados para os produtos em causa devem seguir orientações aceites internacionalmente.

## 5. Requisitos aplicáveis aos laboratórios

- 5.1. Em conformidade com o disposto no Regulamento (CE) n.º 882/2004, os laboratórios devem ser acreditados por um organismo reconhecido que opere em conformidade com o Guia ISO 58, a fim de assegurar que aplicam a garantia de qualidade analítica. Os laboratórios devem ser acreditados em conformidade com a norma EN ISO/IEC 17025.
- 5.2. A competência de um laboratório deve ser comprovada pelo êxito da sua participação contínua em estudos interlaboratoriais para a determinação de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas matrizes relevantes de alimentos para animais e nas gamas de concentrações.
- 5.3. Os laboratórios que aplicam métodos de pré-seleção para o controlo de rotina de amostras devem estabelecer uma estreita cooperação com os laboratórios que aplicam o método de confirmação, tanto para o controlo da qualidade como para a confirmação do resultado analítico de amostras suspeitas.

## 6. Requisitos básicos a cumprir pelo procedimento analítico para determinação de dioxinas (PCDD/F) e de PCB sob a forma de dioxina

### 6.1. Gama de trabalho baixa e limites de quantificação

No que diz respeito aos PCDD/F, as quantidades detetáveis devem ser da gama dos femtogramas superiores ( $10^{-15}$  g) devido à extrema toxicidade de alguns destes compostos. Para a maioria dos congéneres de PCB, o limite de quantificação na gama dos nanogramas ( $10^{-9}$  g) já é suficiente. Quanto à medição dos congéneres de PCB sob a forma de dioxina mais tóxicos (designadamente, os congéneres não-orto substituídos), o limite inferior da gama de trabalho deve atingir os teores baixos dos picogramas ( $10^{-12}$  g). Para todos os restantes congéneres de PCB, é suficiente o limite de quantificação na gama dos nanogramas ( $10^{-9}$  g).

### 6.2. Seletividade (especificidade) elevada

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

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

- 6.3.1. No que diz respeito aos métodos GC/MS, a determinação deve fornecer uma estimativa válida da verdadeira concentração numa amostra. É necessária uma elevada exatidão para se evitar a rejeição do resultado da análise de uma amostra devido à reduzida fiabilidade do valor TEQ determinado. A exatidão é expressa em termos de rigor (diferença entre o valor médio medido para um analito num material certificado e o respetivo valor certificado, expresso em percentagem deste valor) e de precisão ( $RSD_R$ , desvio-padrão relativo, calculado a partir de resultados obtidos em condições de reprodutibilidade).

6.3.2. No que diz respeito aos métodos bioanalíticos, deve determinar-se a recuperação aparente do bioensaio. Por recuperação aparente do bioensaio, entende-se o valor BEQ calculado a partir da curva de calibração da TCDD ou do PCB 126 corrigida em função do resultado do ensaio em branco e, em seguida, dividido pelo valor TEQ determinado por GC/HRMS. Visa corrigir fatores como a perda de PCDD/PCDF e de compostos sob a forma de dioxina durante as fases de extração e de limpeza, compostos co-extraídos que aumentam ou diminuem a resposta (efeitos agonísticos e antagonísticos), a qualidade de ajustamento da curva, ou diferenças entre os valores dos fatores de equivalência tóxica (FET) e da potência relativa (REP). A recuperação aparente do bioensaio é calculada a partir de amostras de referência apropriadas com padrões de congêneres representativos próximos do teor requerido.

6.4. *Validação na gama do teor requerido e medidas gerais de controlo da qualidade*

6.4.1. Os laboratórios devem demonstrar o desempenho de um método na gama do teor requerido (por exemplo,  $0,5 \times 1 \times$  e  $2 \times$  o teor requerido) com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas, durante o procedimento de validação e durante a análise de rotina.

6.4.2. Devem realizar-se controlos regulares com ensaios em branco e com amostras enriquecidas ou análises de amostras de controlo (de preferência, se disponível, material de referência certificado) como medidas internas de controlo da qualidade. Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo da qualidade para ensaios em branco, com amostras enriquecidas, ou análises de amostras de controlo, a fim de garantir que o desempenho analítico está em conformidade com os requisitos.

6.5. *Limite de quantificação*

6.5.1. No que diz respeito ao método bioanalítico de pré-seleção, o estabelecimento do limite de quantificação (LOQ) não é um requisito indispensável, mas deve provar-se que o método é capaz de distinguir entre o valor do ensaio em branco e o valor-limite. Quando se proporciona um valor BEQ, deve estabelecer-se um nível de notificação para lidar com amostras que revelam uma resposta abaixo deste nível. Deve demonstrar-se que o nível de notificação é diferente das amostras em branco do procedimento pelo menos por um fator de três, com uma resposta inferior à gama de trabalho. Por conseguinte, deve ser calculado a partir de amostras que contenham os compostos-alvo próximos do teor mínimo exigido, e não a partir de um rácio S/R ou de um ensaio em branco.

6.5.2. O limite de quantificação (LOQ) de um método de confirmação deve ser de cerca de um quinto do teor requerido.

6.6. *Critérios analíticos*

Para se obterem resultados fiáveis de métodos de confirmação ou de pré-seleção, devem ser satisfeitos os seguintes critérios, respetivamente, para o valor TEQ ou o valor BEQ, quer determinado como valor TEQ total (como a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina) ou separadamente para PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina.

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

(\*) no que diz respeito aos limites máximos

6.7. *Requisitos específicos para métodos de pré-seleção*

6.7.1. Na pré-seleção podem ser utilizados tanto GC/MS como métodos bioanalíticos. Em relação aos métodos GC/MS, devem respeitar-se os requisitos descritos no ponto 7. Quanto aos métodos bioanalíticos baseados em células, os requisitos específicos estão descritos no ponto 8.

6.7.2. Os laboratórios que aplicam métodos de pré-seleção e de controlo de rotina de amostras devem estabelecer uma estreita cooperação com os laboratórios que aplicam o método de confirmação.

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

#### 6.7.4. Controlo da eventual supressão da resposta das células e da citotoxicidade

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

#### 6.7.5. Controlo da qualidade de amostras conformes

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

#### 6.7.6. Determinação das taxas de falsos resultados conformes a partir de dados de controlo da qualidade

Deve determinar-se a taxa de falsos resultados conformes obtidos na pré-seleção de amostras abaixo e acima do limite máximo ou do limiar de intervenção. As taxas reais de falsos resultados conformes devem ser inferiores a 5 %. Quando o controlo da qualidade de amostras conformes revelar, pelo menos, 20 resultados confirmados por matriz/grupo de matrizes, devem ser retiradas conclusões sobre a taxa de falsos resultados conformes a partir dessa base de dados. Os resultados das amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais ou durante incidentes de contaminação, abrangendo uma gama de concentrações que pode atingir, por exemplo,  $2 \times$  o limite máximo (LM), podem também ser incluídos no mínimo de 20 resultados para a avaliação da taxa de falsos resultados conformes. As amostras devem abranger os padrões de congêneres mais frequentes, que representem diferentes fontes.

Embora os ensaios de pré-seleção devam, de preferência, ter como objetivo a deteção de amostras superiores ao limiar de intervenção, o critério para determinar as taxas de falsos resultados conformes é o limite máximo, tendo em conta a incerteza de medição do método de confirmação.

#### 6.7.7. As amostras não conformes suspeitas obtidas na pré-seleção devem ser sempre verificadas por um método de análise de confirmação (GC/HRMS). Estas amostras podem também servir para avaliar a taxa de falsos resultados não conformes. Relativamente aos métodos de pré-seleção, a taxa de falsos resultados não conformes é a fração de resultados conformes confirmados por análises de confirmação GC/HRMS, enquanto na pré-seleção anterior, a amostra tinha sido declarada suspeita de ser não conforme. A avaliação da vantagem do método de pré-seleção baseia-se na comparação de amostras de falsos não conformes com o número total de amostras verificadas. Esta taxa deve ser suficientemente baixa para tornar benéfico o uso do instrumento de pré-seleção.

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

Também em relação aos métodos bioanalíticos realizados em condições de repetibilidade, o  $RSD_r$  intralaboratorial deveria tipicamente ser inferior ao  $RSD_R$  de reprodutibilidade.

### 7. Requisitos específicos aplicáveis aos métodos gc/ms a respeitar para efeitos de pré-selecção ou de confirmação

#### 7.1. Requisitos gerais

A diferença entre o limite superior e o limite inferior não deve exceder 20 % no caso de alimentos para animais com uma contaminação de cerca de 1 ng TEQ-OMS/kg de produto com um teor de humidade de 12 % (com base na soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina). Relativamente a teores de contaminação inferiores, por exemplo, 0,5 ng TEQ-OMS/kg de produto, a diferença entre o limite superior e o limite inferior pode situar-se na gama de 25 %-40 %.

#### 7.2. Controlo das recuperações

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



- 7.2.2. Também devem ser determinados fatores de resposta relativos no caso dos congéneres para os quais não se adiciona um composto análogo marcado com  $^{13}\text{C}$ , através da utilização de soluções de calibração adequadas.
- 7.2.3. Em relação aos alimentos para animais de origem vegetal e aos alimentos para animais de origem animal que contenham menos de 10 % de gorduras, a adição de padrões internos é obrigatória antes da extração. Em relação aos alimentos para animais de origem animal que contenham mais de 10 % de gorduras, os padrões internos são adicionados antes ou após a extração de gorduras. Deve ser efetuada uma validação adequada da eficácia da extração, dependendo da fase em que são introduzidos os padrões internos e de os resultados serem notificados com base no produto ou nas gorduras.
- 7.2.4. Antes da análise por GC/MS, devem ser adicionados 1 ou 2 padrões de recuperação (substitutos).
- 7.2.5. É necessário efetuar o controlo da recuperação. Para os métodos de confirmação, as recuperações de cada padrão interno devem situar-se na gama de 60 % a 120 %. São aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais, nomeadamente para algumas dibenzo-p-dioxinas e alguns dibenzofuranos hepta- e octo-clorados, desde que o seu contributo para o valor TEQ não exceda 10 % do valor TEQ total (com base na soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina). Para os métodos de pré-seleção GC/MS, as recuperações devem situar-se na gama de 30 % a 140 %.
- 7.3. *Remoção de substâncias interferentes*
- Deve proceder-se à separação entre PCDD/F e compostos clorados interferentes, tais como PCB não semelhantes a dioxina e éteres difenílicos clorados através de técnicas cromatográficas adequadas (de preferência, com uma coluna de florisil, alumina e/ou carbono).
  - A separação de isómeros por cromatografia gasosa deve ser < 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 7.4. *Calibração com curva-padrão*
- A gama da curva de calibração deve abranger a gama relevante dos teores requeridos.

## 8. Requisitos específicos para métodos bioanalíticos

Métodos bioanalíticos são métodos baseados na utilização de princípios biológicos, como ensaios com células, ensaios com recetores ou imunoenaios. O presente ponto 8 estabelece requisitos para métodos bioanalíticos em geral.

Um método de pré-seleção, em princípio, classifica uma amostra como conforme ou suspeita de ser não conforme. Para tal, o valor BEQ calculado é comparado com o valor-limite (ver 8.3). As amostras abaixo do valor-limite são declaradas conformes, as amostras iguais ou acima do valor-limite são declaradas suspeitas de ser não conformes e necessitam de uma análise por um método de confirmação. Na prática, um valor BEQ correspondente a 2/3 do limite máximo pode servir como valor-limite mais adequado, assegurando uma taxa de falsos resultados conformes inferior a 5 % e uma taxa aceitável de falsos resultados não conformes. Com limites máximos distintos para PCDD/F e para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina, a verificação da conformidade das amostras sem fracionamento requer valores-limite de bioensaio adequados para os PCDD/F. Para a verificação de amostras que excedam os limiares de intervenção, o valor-limite poderia ser uma percentagem adequada do respetivo teor requerido.

Além disso, no caso de determinados métodos bioanalíticos, pode ser dado um teor indicativo expresso em BEQ para amostras na gama de trabalho e excedendo o limite de notificação (ver 8.1.1 e 8.1.6).

### 8.1. Avaliação da resposta do teste

#### 8.1.1. Requisitos gerais

- O cálculo das concentrações a partir de uma curva de calibração da TCDD apresenta uma grande variação [elevado coeficiente de variação (CV)] dos valores nas extremidades inferior e superior da curva. A gama de trabalho é a área em que esta CV é inferior a 15 %. A extremidade inferior da gama de trabalho (limite de notificação) deve ser estabelecida em, pelo menos, três vezes o valor dos ensaios em branco do procedimento. A extremidade superior da gama de trabalho é habitualmente representada pelo valor  $\text{EC}_{70}$  (70 % da concentração efetiva máxima), mas mais abaixo, caso a CV seja superior a 15 % nesta gama. A gama de trabalho é estabelecida durante a validação. Os valores-limite (ver 8.3) devem situar-se dentro da gama de trabalho.
- As soluções-padrão e os extratos de amostras devem ser testados, pelo menos, em duplicado. No caso de utilização de duplicados, uma solução-padrão ou um extracto-testemunha testado em 4 a 6 cavidades repartidas ao longo da placa deve produzir uma resposta ou concentração (apenas possível na gama de trabalho) com base numa CV < 15 %.

#### 8.1.2. Calibração

##### 8.1.2.1. Calibração com curva-padrão

- Podem estimar-se os teores das amostras comparando a resposta do teste com uma curva de calibração da TCDD (ou do PCB 126 ou de uma mistura-padrão de PCDD/F/PCB sob a forma de dioxina) para calcular o valor BEQ no extrato e, posteriormente, na amostra.

- As curvas de calibração devem conter 8 a 12 concentrações (pelo menos, nos duplicados), com concentrações suficientes na parte inferior da curva (gama de trabalho). Será dada especial atenção à qualidade de ajustamento da curva na gama de trabalho. Como tal, o valor  $R^2$  tem pouco ou nenhum valor para estimar a adequação do ajustamento em regressão não linear. Um melhor ajustamento será alcançado através de uma redução da diferença entre os teores calculados e os teores observados na gama de trabalho da curva, por exemplo, reduzindo ao mínimo a soma de resíduos ao quadrado.
- O teor estimado no extrato de amostra é posteriormente corrigido em função do valor BEQ calculado para uma amostra em branco de matriz/solvente (para ter em conta impurezas provenientes de solventes e produtos químicos utilizados) e da recuperação aparente (calculada a partir do valor BEQ de amostras de referência adequadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor requerido). Para a correção da recuperação, a recuperação aparente deve situar-se dentro da gama exigida (ver ponto 8.1.4). As amostras de referência utilizadas para a correção da recuperação devem cumprir os requisitos indicados no ponto 8.2.

#### 8.1.2.2. Calibração com amostras de referência

Em alternativa, pode utilizar-se uma curva de calibração preparada a partir de, pelo menos, 4 amostras de referência (ver ponto 8.2.4: um ensaio branco de matriz e três amostras de referência com  $0,5 \times$ ,  $1,0 \times$  e  $2,0 \times$  o teor requerido) próximas do teor requerido, eliminando a necessidade de correção em função do ensaio em branco e da recuperação. Neste caso, a resposta do teste correspondente a  $2/3$  do limite máximo (ver ponto 8.3) pode ser calculada diretamente a partir destas amostras e servir de valor-limite. Para a verificação de amostras que excedam os limiares de intervenção, o valor-limite poderia ser uma percentagem adequada destes limiares de intervenção.

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

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

#### 8.1.4. Recuperações aparentes do bioensaio

A «recuperação aparente do bioensaio» deve ser calculada a partir de amostras de referência adequadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor requerido e expressa em percentagem do valor BEQ em comparação com o valor TEQ. Em função do tipo de ensaio e do sistema TEF (\*\*\*\*\*\*) utilizado, as diferenças entre os fatores TEF e REP relativos aos PCB sob a forma de dioxina podem causar recuperações aparentes baixas para os PCB sob a forma de dioxina em comparação com os PCDD/F. Por conseguinte, no caso de uma determinação em separado de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina, as recuperações aparentes do bioensaio devem ser: para os PCB sob a forma de dioxina, de 25 % a 60 %, para os PCDD/F, de 50 % a 130 % (as gamas aplicam-se à curva de calibração da TCDD). Como o contributo dos PCB sob a forma de dioxina para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina pode variar entre diferentes matrizes e amostras, as recuperações aparentes do bioensaio para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina refletem estas gamas e devem situar-se entre 30 % e 130 %. Qualquer implicação que a revisão substantiva dos valores FET tenha para a legislação da União relativa aos PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina exige a revisão destas gamas.

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

#### 8.1.5. Controlo das recuperações para limpeza

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

#### 8.1.6. Limite de notificação

Ao notificar valores BEQ, deve ser determinado um limite de notificação a partir de amostras de matriz pertinentes que envolvam padrões de congéneres típicos, mas não a partir da curva de calibração das normas, devido à baixa precisão na gama inferior da curva. Devem ser tidos em conta os efeitos da extração e da limpeza. O limite de notificação deve ser estabelecido em, pelo menos, três vezes o valor dos ensaios em branco do procedimento.

#### 8.2. Utilização de amostras de referência

8.2.1. As amostras de referência representam a matriz da amostra, os padrões de congéneres e as gamas de concentrações dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina próximos do teor requerido.

8.2.2. Cada série de testes deve comportar um ensaio em branco da matriz e, caso tal não seja possível, um ensaio em branco do procedimento, bem como uma amostra de referência com o teor requerido. Estas amostras devem ser extraídas e testadas no mesmo momento e em condições idênticas. A amostra de referência deve apresentar uma resposta claramente elevada em comparação com a amostra em branco, assegurando assim a adequação do teste. Estas amostras podem servir para as correções em função do ensaio em branco e da recuperação.

- 8.2.3. As amostras de referência escolhidas para efetuar uma correção em função da recuperação devem ser representativas das amostras de ensaio, o que significa que os padrões dos congêneres não podem conduzir a uma subestimação dos teores.
- 8.2.4. Podem incluir-se amostras de referência suplementares com teores  $0,5 \times$  e  $2 \times$  superiores ao teor requerido, para demonstrar o desempenho correto do teste dentro da gama requerida para o controlo do teor requerido. Combinadas, estas amostras podem servir para calcular os valores BEQ das amostras de ensaio (ver ponto 8.1.2.2).

### 8.3. Determinação de valores-limite

A relação entre os resultados bioanalíticos em BEQ e os resultados da GC/HRMS em TEQ deve ser estabelecida, por exemplo, através de experiências de calibração ajustadas em função da matriz, envolvendo amostras de referência enriquecidas a  $0$ ,  $0,5 \times$ ,  $1 \times$  e  $2 \times$  o limite máximo, com seis repetições em cada nível ( $n = 24$ ). Os fatores de correção (em branco e de recuperação) podem ser estimados a partir desta relação, mas devem ser verificados em conformidade com o ponto 8.2.2.

Devem ser estabelecidos valores-limite para decidir da conformidade da amostra com limites máximos ou para verificar se os limiares de intervenção, se relevantes, estão conformes aos respetivos teores requeridos fixados tanto para os PCDD/F e os PCB sob a forma de dioxina, isoladamente, como para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina. São representados pela extremidade *inferior* da distribuição dos resultados bioanalíticos (corrigidos em função do ensaio em branco e da recuperação) correspondendo ao limite de decisão GC/HRMS com base num nível de confiança de 95 %, o que implica uma taxa de falsos resultados conformes  $< 5$  %, e num  $RSD_R < 25$  %. O limite de decisão da GC/HRMS é o limite máximo, tendo em conta a incerteza de medição.

O valor-limite (em BEQ) pode ser calculado em conformidade com uma das abordagens mencionadas nos pontos 8.3.1, 8.3.2 e 8.3.3 (ver figura 1).

- 8.3.1. Utilização da faixa *inferior* do intervalo de previsão de 95 % no limite de decisão da GC/HRMS:

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

em que:

$\text{BEQ}_{\text{DL}}$  o BEQ correspondente ao limite de decisão da GC/HRMS é o limite máximo incluindo a incerteza de medição

$s_{y,x}$  desvio-padrão residual

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

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

$n$  número de repetições em cada nível

$x_i$  concentração da amostra de GC/HRMS (em TEQ) do ponto de calibração  $i$

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

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

- 8.3.2. Cálculo a partir dos resultados bioanalíticos (corrigidos em função do ensaio em branco e da recuperação) de múltiplas análises de amostras ( $n \geq 6$ ), contaminadas no limite de decisão da GC/HRMS, como a extremidade *inferior* da distribuição dos dados no valor BEQ médio correspondente:

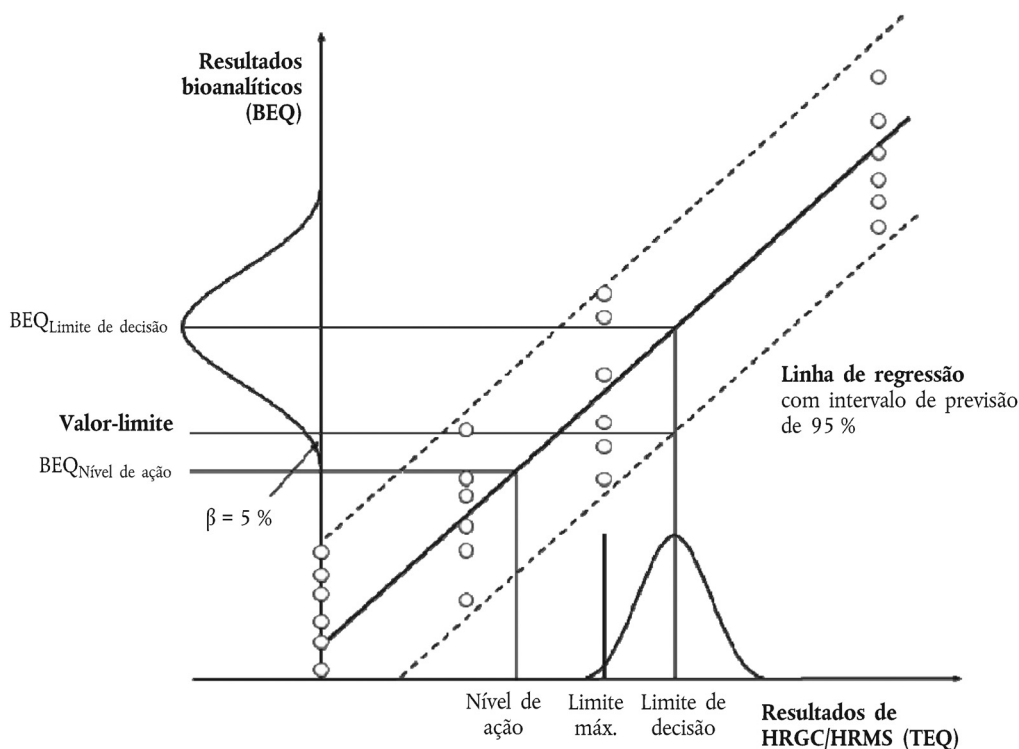
$$\text{Valor-limite} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

em que

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

- 8.3.3. Cálculo como valor médio dos resultados bioanalíticos (em BEQ, corrigido em função do ensaio em branco e da recuperação) a partir de análises múltiplas de amostras ( $n \geq 6$ ) contaminadas em  $2/3$  do teor requerido, com base na observação de que este teor estará próximo do valor-limite determinado em conformidade com o ponto 8.3.1 ou com o ponto 8.3.2:

Figura 1



Cálculo dos valores-limite com base num nível de confiança de 95 %, o que implica uma taxa de falsos resultados conformes  $< 5\%$ , e num  $RSD_R < 25\%$ : 1.<sup>a</sup> partir da faixa inferior do intervalo de previsão de 95 %, no limite de decisão da HRGC/HRMS, 2.<sup>a</sup> partir de análises múltiplas de amostras ( $n \geq 6$ ) contaminadas no limite de decisão HRGC/HRMS como a extremidade inferior da distribuição de dados (representada na figura por uma curva em forma de sino) no valor BEQ médio correspondente.

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

Os valores-limite baseados no BEQ, calculados a partir do  $RSD_R$  obtido durante a validação com um número limitado de amostras com diferentes padrões de matriz/congéneres, podem ser superiores aos teores requeridos baseados em TEQ, devido a uma melhor precisão do que a que é possível em análises de rotina quando um espectro desconhecido de eventuais padrões de congéneres tem de ser controlado. Em tais casos, os valores-limite devem ser calculados a partir de um  $RSD_R = 25\%$ , ou, de preferência, a dois terços do teor requerido.

#### 8.4. Características de desempenho

- 8.4.1. Devem realizar-se testes à repetibilidade dos métodos bioanalíticos para se obterem informações sobre o desvio-padrão numa série de testes e entre séries de testes. A repetibilidade deve ser inferior a 20 % e a reprodutibilidade intralaboratorial inferior a 25 %. Tal deve basear-se nos valores calculados em BEQ após correção em função do ensaio em branco e da recuperação.
- 8.4.2. Como parte do processo de validação, o teste deve demonstrar que discrimina entre uma amostra em branco e um teor no valor-limite, permitindo a identificação de amostras acima do valor-limite correspondente (ver ponto 8.1.2).
- 8.4.3. Devem ser definidos compostos-alvo, eventuais interferências e limites máximos toleráveis para a amostra em branco.
- 8.4.4. O desvio-padrão percentual na resposta ou concentração calculada a partir da resposta (apenas possível na gama de trabalho) de uma determinação em triplicado de um extrato da amostra não pode ser superior a 15 %.
- 8.4.5. Os resultados não corrigidos das amostras de referência expressos em BEQ (ensaio em branco e teor requerido) devem ser utilizados para a avaliação do desempenho do método bioanalítico durante um período de tempo constante.
- 8.4.6. Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo da qualidade para ensaios em branco do procedimento e para cada tipo de amostra de referência, a fim de garantir que o desempenho analítico está em conformidade com os requisitos, nomeadamente no tocante aos ensaios em branco do procedimento, no que respeita à diferença mínima requerida em relação à extremidade inferior da gama de trabalho, e, no tocante às amostras de referência, no que respeita à reprodutibilidade intralaboratorial. Os ensaios em branco do procedimento devem ser controlados de modo a evitar falsos resultados conformes quando subtraídos.

- 8.4.7. Os resultados das análises por GC/HRMS de amostras suspeitas e 2 % a 10 % das amostras conformes (mínimo de 20 amostras por matriz) devem ser recolhidos e utilizados para avaliar o desempenho do método de pré-seleção e a relação entre BEQ e TEQ. Esta base de dados pode ser utilizada para efeitos de reavaliação de valores-limite aplicáveis às amostras de rotina para as matrizes validadas.
- 8.4.8. Os bons desempenhos do método podem também ser demonstrados pela participação em ensaios interlaboratoriais. Os resultados de amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, abrangendo uma gama de concentrações que pode atingir, por exemplo,  $2 \times$  o limite máximo, podem ser incluídos na avaliação da taxa de falsos resultados conformes, se um laboratório estiver em condições de demonstrar os seus bons desempenhos. As amostras devem abranger os padrões de congéneres mais frequentes, que representem diferentes fontes.
- 8.4.9. Em caso de incidentes, os valores-limite podem ser reavaliados, refletindo a matriz e os padrões de congéneres específicos para cada incidente.

## 9. Notificação dos resultados

### 9.1. Métodos de confirmação

- 9.1.1. Na medida em que o procedimento analítico utilizado o permita, os resultados analíticos devem conter os teores de cada congénere de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e serem notificados em termos de limite inferior, limite superior e limite médio, a fim de incluir o máximo de informações possível na notificação dos resultados e, deste modo, permitir a interpretação dos resultados de acordo com requisitos específicos.
- 9.1.2. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F, dos PCB sob a forma de dioxina e dos lípidos.
- 9.1.3. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 7.2.5, se o limite máximo for excedido e noutros casos mediante pedido.
- 9.1.4. Como a incerteza de medição deve ser tida em conta ao decidir da conformidade de uma amostra, este parâmetro deve ser disponibilizado. Assim, os resultados analíticos devem ser notificados enquanto  $x \pm U$ , em que  $x$  é o resultado analítico e  $U$  é a incerteza expandida da medição, utilizando um fator de expansão de 2, o que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. No caso de uma determinação em separado dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, a soma da incerteza expandida estimada dos resultados analíticos separados dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina deve ser utilizada para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.
- 9.1.5. Se a incerteza de medição for tida em conta mediante a aplicação de  $CC\alpha$  (tal como descrito no ponto 2.2), este parâmetro deve ser mencionado.
- 9.1.6. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os limites máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.

### 9.2. Métodos bioanalíticos de pré-seleção

- 9.2.1. O resultado da pré-seleção deve ser expresso como «conforme» ou «suspeito de ser não conforme» («suspeito»).
- 9.2.2. Além disso, pode ser dado um resultado de PCDD/F e/ou de PCB sob a forma de dioxina expresso em BEQ, e não TEQ.
- 9.2.3. Se a incerteza de medição do valor BEQ calculado for dada, por exemplo, sob a forma de um desvio-padrão, deve basear-se em, pelo menos, uma análise em triplicado, incluindo extração, limpeza e determinação da resposta de ensaio.
- 9.2.4. As amostras com uma resposta inferior ao limite de notificação devem ser indicadas como «inferiores ao limite de notificação».
- 9.2.5. Para cada tipo de matriz da amostra, o relatório deve mencionar o teor requerido em que se baseia a avaliação.
- 9.2.6. O relatório deve mencionar o tipo de teste aplicado, o princípio de base do teste e o tipo de calibração.
- 9.2.7. O relatório deve incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F, dos PCB sob a forma de dioxina e dos lípidos.

## CAPÍTULO III

### Preparação de amostras e requisitos respeitantes aos métodos de análise utilizados no controlo oficial dos teores de PCB não semelhantes a dioxinas (PCB # 28, 52, 101, 138, 153 e 180)

#### 1. Métodos de deteção aplicáveis

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

## 2. Identificação e confirmação dos analitos requeridos

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

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

### 2.3. Requisitos aplicáveis a técnicas GC/MS

Verificação de, pelo menos:

- a) dois iões específicos, para a HRMS,
- b) dois iões específicos de  $m/z > 200$  ou três iões específicos de  $m/z > 100$  para a LRMS,
- c) 1 precursor e 2 iões-produto para MS-MS.

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

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

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

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

### 2.4. Requisitos aplicáveis a técnicas GC/ECD:

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

## 3. Demonstração do desempenho do método

Deve validar-se o desempenho do método na gama do teor requerido (0,5 a 2 vezes o teor requerido) com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas (ver requisitos aplicáveis à precisão intermédia mencionados no ponto 8).

## 4. Limite de quantificação

Os valores dos ensaios em branco não devem ser superiores a 30 % do nível de contaminação correspondente ao nível máximo (\*\*\*\*\*).

(\*\*\*\*\*\*) Recomenda-se vivamente um contributo inferior do teor do ensaio em branco do reagente para o teor de um contaminante numa amostra. Cabe ao laboratório controlar a variação dos teores dos ensaios em branco, em especial, se se subtraírem os teores dos ensaios em branco.

## 5. Controlo da qualidade

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

## 6. Controlo de recuperações

- 6.1. Devem utilizar-se padrões internos adequados, com propriedades físico-químicas comparáveis às dos analitos requeridos.
- 6.2. Adição de padrões internos:  
Adição a produtos (antes do processo de extração e limpeza).
- 6.3. Requisitos aplicáveis a métodos que utilizem os seis congéneres de PCB indicadores marcados com isótopos:
- os resultados devem ser corrigidos em função das recuperações de padrões internos,
  - as recuperações de padrões internos marcados com isótopos devem situar-se entre 50 % e 120 %,
  - são aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais cujo contributo para a soma dos seis PCB indicadores seja inferior a 10 %.
- 6.4. Requisitos aplicáveis a métodos que não utilizem os seis padrões internos marcados com isótopos ou que utilizem outros padrões internos:
- a recuperação de padrões internos deve ser controlada para cada amostra,
  - as recuperações de padrões internos devem situar-se entre 60 % e 120 %,
  - os resultados devem ser corrigidos em função das recuperações de padrões internos.
- 6.5. As recuperações de congéneres não marcados devem ser verificadas com amostras enriquecidas ou amostras de controlo da qualidade com concentrações na gama do teor requerido. Consideram-se aceitáveis as recuperações destes congéneres se se situarem entre 70 % e 120 %.

## 7. Requisitos aplicáveis aos laboratórios

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

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

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

## 9. Notificação dos resultados

- 9.1. Na medida em que o procedimento analítico utilizado o permita, os resultados analíticos devem conter os níveis de cada congénere de PCB e ser indicados como limite inferior, limite superior e limite médio, a fim de incluir o máximo de informações possível na notificação dos resultados e, deste modo, permitir a interpretação dos resultados de acordo com requisitos específicos.
- 9.2. Deve constar da notificação o método utilizado na extração de PCB e de lípidos.
- 9.3. As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 6, se o limite máximo for excedido e noutros casos mediante pedido.
- 9.4. Como a incerteza de medição deve ser tida em conta ao decidir da conformidade de uma amostra, este parâmetro deve igualmente ser disponibilizado. Assim, os resultados analíticos devem ser notificados enquanto  $x \pm U$ , em que  $x$  é o resultado analítico e  $U$  é a incerteza expandida da medição, utilizando um fator de expansão de 2, o que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %.
- 9.5. Se a incerteza de medição for tida em conta mediante a aplicação de CC $\alpha$  (tal como descrito no ponto 2.1 do capítulo I), este parâmetro deve ser mencionado.
- 9.6. Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com, pelo menos, o mesmo número de algarismos significativos que os limites máximos definidos na Diretiva 2002/32/CE.».