

**REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) 2021/808 DA COMISSÃO****de 22 de março de 2021****relativo ao desempenho dos métodos analíticos para os resíduos de substâncias farmacologicamente ativas utilizadas em animais produtores de géneros alimentícios e à interpretação dos resultados, bem como aos métodos a utilizar na amostragem, e que revoga as Decisões 2002/657/CE e 98/179/CE****(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 (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de março de 2017, relativo aos controlos oficiais e outras atividades oficiais que visam assegurar a aplicação da legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais e das regras sobre saúde e bem-estar animal, fitossanidade e produtos fitofarmacêuticos, que altera os Regulamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 do Parlamento Europeu e do Conselho, os Regulamentos (CE) n.º 1/2005 e (CE) n.º 1099/2009 do Conselho, e as Diretivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE do Conselho, e que revoga os Regulamentos (CE) n.º 854/2004 e (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, as Diretivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE do Conselho e a Decisão 92/438/CEE do Conselho (Regulamento sobre os controlos oficiais) <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 34.º, n.º 6,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (UE) 2017/625 estabelece regras para a realização de controlos oficiais e outras atividades oficiais pelas autoridades competentes dos Estados-Membros a fim de verificar o cumprimento da legislação da União no domínio da segurança dos alimentos, entre outros, em todas as fases do processo de produção, transformação e distribuição. Estabelece regras específicas para os controlos oficiais de substâncias cuja utilização possa resultar em resíduos nos géneros alimentícios e nos alimentos para animais e estabelece requisitos gerais para os métodos a utilizar na amostragem, nas análises e nos ensaios laboratoriais efetuados durante os controlos oficiais e outras atividades oficiais.
- (2) A Decisão 2002/657/CE da Comissão <sup>(2)</sup> estabelece requisitos para o desempenho de métodos analíticos e a interpretação de resultados das análises de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e produtos animais e a Decisão 98/179/CE da Comissão <sup>(3)</sup> estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos. Ambas as decisões foram adotadas com base na Diretiva 96/23/CE do Conselho <sup>(4)</sup>, que foi revogada pelo Regulamento (UE) 2017/625. Tendo em conta os novos desenvolvimentos científicos, essas regras devem ser atualizadas e integradas no quadro dos controlos oficiais definido pelo Regulamento (UE) 2017/625.
- (3) Em conformidade com o artigo 1.º, n.º 2, da Decisão 2002/657/CE, essa decisão não se aplica às substâncias relativamente às quais exista legislação da União que estabeleça normas mais específicas. Essas substâncias são as micotoxinas presentes nos géneros alimentícios, as dioxinas e os bifenilos policlorados (PCB) sob a forma de dioxina nos géneros alimentícios e o chumbo, o cádmio, o mercúrio e o benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. As micotoxinas nos géneros alimentícios devem satisfazer os requisitos estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 401/2006 da Comissão <sup>(5)</sup> que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. No caso das dioxinas e dos PCB sob a forma de dioxina, aplica-se o Regulamento (UE) 2017/644 da Comissão <sup>(6)</sup> que estabelece métodos de amostragem e análise para o controlo dos

<sup>(1)</sup> JO L 95 de 7.4.2017, p. 1.

<sup>(2)</sup> Decisão 2002/657/CE da Comissão, de 14 de agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (JO L 221 de 17.8.2002, p. 8).

<sup>(3)</sup> Decisão 98/179/CE da Comissão, de 23 de fevereiro de 1998, que estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos (JO L 65 de 5.3.1998, p. 31).

<sup>(4)</sup> Diretiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos e que revoga as Diretivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE (JO L 125 de 23.5.1996, p. 10).

<sup>(5)</sup> Regulamento (CE) n.º 401/2006 da Comissão, de 23 de fevereiro de 2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios (JO L 70 de 9.3.2006, p. 12).

<sup>(6)</sup> Regulamento (UE) 2017/644 da Comissão, de 5 de abril de 2017, que estabelece métodos de amostragem e análise para o controlo dos teores de dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas em determinados géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (UE) n.º 589/2014 (JO L 92 de 6.4.2017, p. 9).

teores de dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas em determinados géneros alimentícios. O Regulamento (CE) n.º 333/2007 da Comissão <sup>(7)</sup> estabelece disposições em matéria de amostragem e de análise para os controlos oficiais de chumbo, cádmio, mercúrio e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios.

- (4) Por razões de clareza e de segurança jurídica, é adequado reunir as disposições aplicáveis à amostragem e análise de substâncias farmacologicamente ativas num único ato jurídico, como no caso das micotoxinas, dioxinas, dos PCB sob a forma de dioxina, chumbo, cádmio, mercúrio e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios.
- (5) As Decisões 98/179/CE e 2002/657/CE devem, por conseguinte, ser revogadas e substituídas pelo presente regulamento.
- (6) Em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho <sup>(8)</sup>, os coccidiostáticos e histomonostáticos podem ser utilizados como aditivos na alimentação animal, pelo que o Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão <sup>(9)</sup> que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais é aplicável às análises do seu teor nos alimentos para animais. Contudo, o referido regulamento deverá aplicar-se sempre que os alimentos para animais sejam analisados no âmbito de ações de acompanhamento durante investigações sobre a proveniência de amostras não conformes, em casos de suspeita de incumprimento ou de incumprimento comprovado das regras da União aplicáveis à utilização ou aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas autorizadas em medicamentos veterinários ou como aditivos para a alimentação animal, ou das regras da União aplicáveis à utilização ou aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas proibidas ou não autorizadas.
- (7) A fim de assegurar a continuidade na realização dos controlos oficiais e outras atividades oficiais no que se refere aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas e para evitar que todos os métodos tenham de ser revalidados em simultâneo, os métodos que tenham sido validados antes da data de entrada em vigor do presente regulamento podem continuar a ser utilizados durante um período limitado, desde que satisfeitos os requisitos referidos no anexo I, pontos 2 e 3, da Decisão 2002/657/CE. É, por conseguinte, adequado conceder aos Estados-Membros tempo suficiente para aplicarem os requisitos estabelecidos no presente regulamento a todos os métodos analíticos.
- (8) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Vegetais, Animais e Alimentos para Consumo Humano e Animal,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

#### Artigo 1.º

#### Objeto e âmbito de aplicação

O presente regulamento estabelece regras para os métodos de análise utilizados na amostragem e nas análises laboratoriais no que se refere aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas em animais vivos produtores de géneros alimentícios, suas partes e fluidos, excrementos, tecidos, produtos de origem animal, subprodutos animais, alimentos para animais e água. Estabelece igualmente regras para a interpretação dos resultados analíticos dessas análises laboratoriais.

O presente regulamento aplica-se aos controlos oficiais destinados a verificar o cumprimento dos requisitos relativos à presença de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas.

<sup>(7)</sup> Regulamento (CE) n.º 333/2007 da Comissão, de 28 de março de 2007, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo dos teores de oligoelementos e de contaminantes derivados da transformação nos géneros alimentícios (JO L 88 de 29.3.2007, p. 29).

<sup>(8)</sup> Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à alimentação animal (JO L 268 de 18.10.2003, p. 29).

<sup>(9)</sup> Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão, de 27 de janeiro de 2009, que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais (JO L 54 de 26.2.2009, p. 1).

## Artigo 2.º

**Definições**

Para efeitos do presente regulamento, são aplicáveis as definições constantes do artigo 2.º do Regulamento Delegado (UE) 2019/2090 da Comissão <sup>(10)</sup>, do Regulamento (UE) 2019/1871 da Comissão <sup>(11)</sup>, do artigo 2.º do Regulamento (CE) n.º 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho <sup>(12)</sup> e do Regulamento (CEE) n.º 315/93 do Conselho <sup>(13)</sup>.

São igualmente aplicáveis as seguintes definições:

- 1) «recuperação absoluta», o rendimento da fase final de um processo analítico para um analito, dividido pela quantidade de analito na amostra original, expresso em percentagem;
- 2) «exatidão», o grau de concordância entre o resultado dum ensaio e o verdadeiro valor de referência aceite, determinado através da estimativa da veracidade e da precisão <sup>(14)</sup>;
- 3) «erro alfa ( $\alpha$ )», a probabilidade de a amostra analisada ser conforme, apesar de se ter obtido um resultado de medição não conforme;
- 4) «analito», o componente de um sistema a analisar;
- 5) «substância autorizada», uma substância farmacologicamente ativa cuja utilização em animais produtores de géneros alimentícios é autorizada em conformidade com a Diretiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho <sup>(15)</sup>;
- 6) «erro beta ( $\beta$ )», a probabilidade de a amostra analisada ser, na realidade, não conforme, apesar de se ter obtido um resultado de medição conforme;
- 7) «desvio sistemático», a diferença entre o valor estimado do resultado do ensaio e um valor de referência aceite;
- 8) «padrão de calibração», uma referência de medição rastreável que relaciona a quantidade de substância de interesse com uma base de referência;
- 9) «material de referência certificado» (MRC), um material de referência, acompanhado de documentação emitida por um organismo delegado e que proporciona um ou mais valores de propriedades especificados, com incertezas e rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos <sup>(16)</sup>;
- 10) «cromatografia», uma técnica em que uma substância desconhecida é aplicada a um suporte cromatográfico juntamente com um ou mais compostos conhecidos, esperando-se que o comportamento relativo das substâncias desconhecidas e das substâncias conhecidas contribua para a identificação da substância desconhecida;
- 11) «estudo colaborativo», a análise da(s) mesma(s) amostra(s) utilizando o mesmo método para determinar as características de desempenho do método em diferentes laboratórios, em que o estudo permite calcular o erro aleatório de medição e o desvio sistemático do laboratório para o método utilizado;

<sup>(10)</sup> Regulamento Delegado (UE) 2019/2090 da Comissão, de 19 de junho de 2019, que complementa o Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito aos casos de suspeita de incumprimento ou de incumprimento comprovado das regras da União aplicáveis à utilização ou aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas autorizadas em medicamentos veterinários ou como aditivos para a alimentação animal ou das regras da União aplicáveis à utilização ou aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas proibidas ou não autorizadas (JO L 317 de 9.12.2019, p. 28).

<sup>(11)</sup> Regulamento (UE) 2019/1871 da Comissão, de 7 de novembro de 2019, relativo aos valores de referência para a tomada de medidas para substâncias farmacologicamente ativas não autorizadas presentes nos géneros alimentícios de origem animal e que revoga a Decisão 2005/34/CE (JO L 289 de 8.11.2019, p. 41).

<sup>(12)</sup> Regulamento (CE) n.º 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de maio de 2009, que prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal, que revoga o Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho e que altera a Diretiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 726/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho (JO L 152 de 16.6.2009, p. 11).

<sup>(13)</sup> Regulamento (CEE) n.º 315/93 do Conselho, de 8 de fevereiro de 1993, que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios (JO L 37 de 13.2.1993, p. 1).

<sup>(14)</sup> ISO 3534-1: 2006 Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: General statistical terms and terms used in probability (Chapter 1).

<sup>(15)</sup> Diretiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de novembro de 2001, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários (JO L 311 de 28.11.2001, p. 1).

<sup>(16)</sup> JCGM 200:2008, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM), Third Edition 2008: <https://www.iso.org/sites/JCGM/VIM-JCGM200.htm> (Chapter 5, Measurement standards (Etalons)).

- 12) «método de confirmação», um método que fornece informações completas ou complementares para a identificação inequívoca de uma substância e, caso necessário, a sua quantificação de uma das seguintes formas:
- a) no limite máximo de resíduos ou no limite máximo para as substâncias autorizadas;
  - b) no valor de referência para a tomada de medidas, no caso das substâncias proibidas ou não autorizadas, para as quais tenha sido estabelecido um valor de referência para a tomada de medidas;
  - c) a uma concentração tão baixa quanto razoavelmente possível, no caso de uma substância proibida ou não autorizada, para a qual não esteja estabelecido um valor de referência para a tomada de medidas;
- 13) «fator de expansão (k)», um número que exprime o nível de confiança desejado e que está associado à incerteza de medição expandida;
- 14) «limite de decisão para a confirmação (CC $\alpha$ )», o limite no qual e a partir do qual se pode concluir, com uma probabilidade de erro de  $\alpha$ , que uma amostra não é conforme e o valor  $1 - \alpha$  representa a certeza estatística, em percentagem, de que o limite permitido foi excedido;
- 15) «capacidade de deteção para a triagem (CC $\beta$ )», o teor mais baixo de analito que pode ser detetado ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de  $\beta$ :
- a) no caso das substâncias farmacologicamente ativas proibidas ou não autorizadas, a CC $\beta$  é a concentração mais baixa à qual um método é capaz de detetar ou quantificar, com uma certeza estatística de  $1 - \beta$ , amostras contendo resíduos de substâncias proibidas ou não autorizadas;
  - b) no caso das substâncias autorizadas, a CC $\beta$  é a concentração à qual o método é capaz de detetar concentrações inferiores ao limite permitido com uma certeza estatística de  $1 - \beta$ ;
- 16) «amostra fortificada», uma amostra enriquecida com uma quantidade conhecida do analito a detetar ou quantificar;
- 17) «estudo interlaboratorial», a organização, a realização e a avaliação dos ensaios da(s) mesma(s) amostra(s) por dois ou mais laboratórios de acordo com condições preestabelecidas, para avaliar o desempenho dos ensaios, quer enquanto estudo colaborativo, quer enquanto ensaio de aptidão;
- 18) «padrão interno (PI)», uma substância que não se encontra presente na amostra e que tem propriedades físico-químicas tão semelhantes quanto possível às do analito a identificar ou quantificar;
- 19) «nível requerido», a concentração de uma substância ou de um analito numa amostra que é significativa para determinar a sua conformidade com a legislação, no que diz respeito a:
- a) limite máximo de resíduos ou limite máximo para as substâncias autorizadas, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 124/2009 da Comissão <sup>(17)</sup> e o Regulamento (UE) n.º 37/2010 da Comissão <sup>(18)</sup>;
  - b) valores de referência para a tomada de medidas, no caso das substâncias proibidas ou não autorizadas, para as quais é estabelecido um valor de referência para a tomada de medidas em conformidade com o Regulamento (UE) 2019/1871;
  - c) uma concentração tão baixa quanto analiticamente alcançável, no caso das substâncias proibidas ou não autorizadas, para as quais não está estabelecido um valor de referência para a tomada de medidas;
- 20) «teor mínimo calibrado» (TMC), a concentração mais baixa a que o sistema de medição foi calibrado;
- 21) «matriz», o material do qual é colhida uma amostra;
- 22) «efeito de matriz», a diferença na resposta analítica entre um padrão dissolvido no solvente e um padrão ajustado em função da matriz, quer sem correção por recurso a um padrão interno, quer com correção com recurso a um padrão interno;

<sup>(17)</sup> Regulamento (CE) n.º 124/2009 da Comissão, de 10 de fevereiro de 2009, que define limites máximos para a presença de coccidiostáticos ou histomonostáticos em géneros alimentícios resultante da contaminação cruzada inevitável destas substâncias em alimentos não visados para animais (JO L 40 de 11.2.2009, p. 7).

<sup>(18)</sup> Regulamento (UE) n.º 37/2010 da Comissão, de 22 de dezembro de 2009, relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal (JO L 15 de 20.1.2010, p. 1).

- 23) «padrão ajustado em função da matriz», uma matriz em branco (isto é, sem analito), à qual o analito é adicionado numa gama de concentrações após o processamento da amostra;
- 24) «padrão de matriz fortificada», uma matriz em branco (isto é, sem analito), que, antes da extração por solventes e do processamento da amostra, é fortificada com o analito numa gama de concentrações;
- 25) «mesuranda», a grandeza particular sujeita a medição;
- 26) «incerteza de medição», um parâmetro não negativo associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam razoavelmente ser atribuídos à mesuranda, com base nas informações utilizadas;
- 27) «critérios de desempenho», os requisitos relativos a uma característica do desempenho de acordo com os quais se pode considerar que o método analítico é adequado para a utilização pretendida e dá origem a resultados fiáveis;
- 28) «precisão», o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições específicas e é expressa como o desvio-padrão ou coeficiente de variação dos resultados de ensaio;
- 29) «método qualitativo», um método analítico que deteta ou identifica uma substância ou um grupo de substâncias com base nas suas propriedades químicas, biológicas ou físicas;
- 30) «método quantitativo», um método analítico que determina a quantidade ou a fração mássica de uma substância de forma a poder exprimi-la através de um valor numérico com as unidades apropriadas;
- 31) «recuperação», a quantidade de um analito, corrigida em função da recuperação, dividida pela quantidade fortificada do analito na amostra da matriz, expressa em percentagem;
- 32) «correção da recuperação», a utilização de padrões internos, a utilização de uma curva de calibração de matriz, bem como a utilização de um fator de correção da recuperação e, ainda, uma combinação destas abordagens;
- 33) «material de referência», um material suficientemente homogéneo e estável em relação a uma ou mais propriedades especificadas, que se estabeleceu ser adequado para o fim a que se destina num processo de medição ou no exame de propriedades nominais <sup>(19)</sup>;
- 34) «efeito de matriz relativo», a diferença na resposta analítica entre um padrão dissolvido no solvente e um padrão ajustado em função da matriz com uma correção por recurso a um padrão interno;
- 35) «repetibilidade», a precisão em condições nas quais os resultados de ensaios independentes são obtidos com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, dentro de curtos intervalos de tempo;
- 36) «reprodutibilidade», a precisão em condições nas quais os resultados de ensaios são obtidos com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, em laboratórios diferentes, com operadores diferentes utilizando equipamento diferente <sup>(20)</sup>;
- 37) «robustez», a suscetibilidade de um método analítico a alterações nas condições experimentais em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações especificadas;
- 38) «método de triagem», um método utilizado para a triagem de uma substância ou classe de substâncias ao nível requerido;
- 39) «concentração-alvo para a triagem» (STC — *screening target concentration*), a concentração inferior ou igual à CC $\beta$  à qual uma medição de triagem classifica a amostra como «triagem positiva» potencialmente não conforme e desencadeia um ensaio de confirmação;
- 40) «seletividade», a capacidade de um método distinguir o analito a medir de outras substâncias;
- 41) «estudo unilaboratorial» ou «validação interna», o 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;

<sup>(19)</sup> Comissão do *Codex Alimentarius*, Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas/Organização Mundial da Saúde, Guidelines on analytical terminology (CAC/GL 72-2009).

<sup>(20)</sup> ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions (Chapter 3).

- 42) «adição de padrão», um procedimento em que uma parte da amostra é analisada sem qualquer tratamento prévio e às restantes, antes de se proceder à análise, adicionam-se quantidades conhecidas de padrão do analito;
- 43) «padrão do analito», um analito de teor e pureza conhecidos e certificados, destinado a ser utilizado como referência no processo analítico;
- 44) «substância», matéria com composição constante, caracterizada pelas entidades que a compõem e por determinadas propriedades físicas;
- 45) «toma de ensaio», a quantidade de material retirado da amostra sobre a qual se realiza o ensaio ou a observação;
- 46) «veracidade», o grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência aceite;
- 47) «unidades», as unidades descritas na norma ISO 80000 <sup>(21)</sup> e na Diretiva 80/181/CEE do Conselho <sup>(22)</sup>;
- 48) «validação», a demonstração, mediante exame, e o fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida <sup>(23)</sup>, através de um estudo unilaboratorial ou de um estudo colaborativo;
- 49) «reprodutibilidade intralaboratorial» ou «precisão intermédia/reprodutibilidade interna», a precisão da medição de acordo com uma série de condições intralaboratoriais num laboratório específico.

### Artigo 3.º

#### Métodos de análise

Os Estados-Membros devem assegurar que as amostras colhidas em conformidade com o artigo 34.º do Regulamento (UE) 2017/625 são analisadas utilizando métodos que satisfaçam os seguintes requisitos:

- 1) Estão documentados em instruções de ensaio, de preferência de acordo com os anexos da norma ISO 78-2:1999 Chemistry-Layouts for standards — Part 2: Methods of chemical analysis <sup>(24)</sup>;
- 2) Satisfazem os critérios de desempenho e outros requisitos aplicáveis aos métodos analíticos estabelecidos no anexo I, capítulo 1, do presente regulamento;
- 3) Foram validados em conformidade com os requisitos estabelecidos no anexo I, capítulos 2 e 4, do presente regulamento;
- 4) Permitem a aplicação dos valores de referência para a tomada de medidas estabelecidos no Regulamento (UE) 2019/1871, a identificação da presença de substâncias proibidas e não autorizadas e a aplicação de limites máximos (LM), que foram fixados com base no Regulamento (CEE) n.º 315/93 e no Regulamento (CE) n.º 124/2009, e de limites máximos de resíduos (LMR), que foram fixados com base nos Regulamentos (CE) n.º 1831/2003 e (CE) n.º 470/2009.

### Artigo 4.º

#### Controlo da qualidade

Os Estados-Membros devem assegurar a qualidade dos resultados das análises efetuadas nos termos do Regulamento (UE) 2017/625, em especial através de ensaios de monitorização ou de resultados de calibração, em conformidade com a norma ISO/IEC 17025:2017 relativa aos requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, e com os requisitos aplicáveis ao controlo da qualidade durante as análises de rotina estabelecidos no anexo I, capítulo 3, do presente regulamento.

<sup>(21)</sup> ISO 80000-1:2009 Quantities and units — Part 1: General (Introduction).

<sup>(22)</sup> Diretiva 80/181/CEE do Conselho, de 20 de dezembro de 1979, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes às unidades de medida e que revoga a Diretiva 71/354/CEE (JO L 39 de 15.2.1980, p. 40).

<sup>(23)</sup> ISO/IEC 17025:2017 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (capítulo 3).

<sup>(24)</sup> ISO 78-2: 1999 Chemistry — Layouts for standards — Part 2: Methods of chemical analysis (Annexes).

*Artigo 5.º***Interpretação dos resultados**

1. O resultado de uma análise é considerado não conforme se for igual ou superior ao limite de decisão para a confirmação (CC $\alpha$ ).
2. Para as substâncias autorizadas para as quais tenha sido estabelecido um LMR ou um LM, o limite de decisão para a confirmação (CC $\alpha$ ) é a concentração à qual e a partir da qual se pode decidir, com uma certeza estatística de valor numérico  $1 - \alpha$ , que o limite permitido foi excedido.
3. Para as substâncias não autorizadas ou proibidas ou para as substâncias autorizadas para as quais não tenha sido estabelecido nenhum LMR ou LM numa espécie ou produto específico, o limite de decisão para a confirmação (CC $\alpha$ ) é o nível de concentração mais baixo a que se pode decidir, com uma certeza estatística de valor numérico  $1 - \alpha$ , que o analito em questão está presente.
4. Para as substâncias farmacologicamente ativas não autorizadas ou proibidas, o erro  $\alpha$  deve ser de 1% ou inferior. Para todas as outras substâncias, o erro  $\alpha$  deve ser de 5% ou inferior.

*Artigo 6.º***Métodos de amostragem**

Os Estados-Membros devem assegurar que as amostras são colhidas, manipuladas e rotuladas em conformidade com os métodos de amostragem pormenorizados estabelecidos no anexo II do presente regulamento.

*Artigo 7.º***Revogações e medidas transitórias**

As Decisões 2002/657/CE e 98/179/CE são revogadas a partir da data de entrada em vigor do presente regulamento.

No entanto, até 10 de junho de 2026, os requisitos estabelecidos nos pontos 2 e 3 do anexo I da Decisão 2002/657/CE continuam a aplicar-se aos métodos que tenham sido validados antes da data de entrada em vigor do presente regulamento.

*Artigo 8.º***Entrada em vigor**

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

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

Feito em Bruxelas, em 22 de março de 2021.

*Pela Comissão*  
*A Presidente*  
Ursula VON DER LEYEN

## ANEXO I

## CAPÍTULO 1

**CRITÉRIOS DE DESEMPENHO E OUTROS REQUISITOS PARA OS MÉTODOS ANALÍTICOS****1.1. Requisitos para os métodos de triagem****1.1.1. *Categorias de métodos de triagem adequados***

Devem ser utilizados métodos qualitativos, semiquantitativos ou quantitativos como métodos de triagem adequados.

**1.1.2. Requisitos para os métodos de triagem biológicos, bioquímicos ou físico-químicos**

Para as substâncias proibidas ou não autorizadas, a  $CC\beta$  deve ser tão baixa quanto razoavelmente alcançável e, em qualquer caso, inferior ao valor de referência para a tomada de medidas (RTM), no que se refere às substâncias para as quais estão estabelecidos RTM nos termos do Regulamento (UE) 2019/1871.

Para as substâncias farmacologicamente ativas autorizadas, a  $CC\beta$  deve ser inferior ao limite máximo de resíduos (LMR) ou ao limite máximo (LM).

Para efeitos de triagem, apenas se podem utilizar métodos analíticos em relação aos quais se possa demonstrar de forma documentada e reproduzível que estão validados e têm uma taxa de falsos resultados conformes inferior ou igual a 5% (erro  $\beta$ ). Em caso de suspeita de resultado não conforme, esse resultado deve ser confirmado através de um método de confirmação.

Os métodos de triagem quantitativos utilizados tanto para a triagem como para a confirmação devem satisfazer os mesmos requisitos de exatidão, intervalo e precisão descritos nos pontos 1.2.2.1 e 1.2.2.2.

**1.2. Requisitos para os métodos de confirmação****1.2.1. *Requisitos gerais para os métodos de confirmação***

Para as substâncias proibidas ou não autorizadas, o  $CC\alpha$  deve ser tão baixo quanto razoavelmente alcançável. Para as substâncias proibidas ou não autorizadas para as quais está estabelecido um RTM nos termos do Regulamento (UE) 2019/1871, o  $CC\alpha$  deve ser inferior ou igual ao valor de referência para a tomada de medidas.

Para as substâncias autorizadas, o  $CC\alpha$  deve ser superior, mas tão aproximado quanto possível do LMR ou do LM.

Para efeitos de confirmação, apenas se podem utilizar métodos analíticos em relação aos quais se possa demonstrar de forma documentada e reproduzível que estão validados e têm uma taxa de falsos resultados não conformes (erro  $\alpha$ ) inferior ou igual a 1% para as substâncias proibidas ou não autorizadas, ou inferior ou igual a 5% para as substâncias autorizadas.

Os métodos de confirmação devem fornecer informações sobre a composição química estrutural do analito. Consequentemente, os métodos de confirmação que utilizam apenas a análise cromatográfica, sem recurso a um sistema de deteção por espectrometria de massa, não são adequados para utilização isolada enquanto métodos de confirmação para as substâncias farmacologicamente ativas proibidas ou não autorizadas. No caso de a espectrometria de massa não ser adequada para as substâncias autorizadas, podem ser utilizados outros métodos, como HPLC-DAD e -FLD, ou uma combinação dos mesmos.

Quando necessário de acordo com o método de confirmação, deve ser adicionado um padrão interno apropriado à toma de ensaio, no início do processo de extração. Em função da disponibilidade, usar-se-ão quer formas estáveis isotopicamente marcadas do analito, particularmente adequadas para a deteção por espectrometria de massa, quer compostos análogos que apresentem uma relação estrutural próxima com o analito. Quando não for possível utilizar um padrão interno adequado, a identificação do analito deve ser confirmada, de preferência, através de cocromatografia<sup>(1)</sup>. Neste caso, deve obter-se apenas um pico, cujo incremento na altura (ou área) deve ser equivalente à quantidade de analito adicionada. Se tal não for praticável, devem ser utilizados padrões ajustados em função da matriz ou padrões de matriz fortificada.

<sup>(1)</sup> A cocromatografia é um processo em que, antes da execução da cromatografia, o extrato da amostra é dividido em duas partes. Uma das partes é submetida a cromatografia sem qualquer tratamento prévio. A outra parte é misturada com o padrão do analito a medir. Em seguida, procede-se também à cromatografia desta mistura. A quantidade adicionada de padrão de analito tem de ser semelhante à quantidade estimada de analito no extrato. A cocromatografia é utilizada para melhorar a identificação de um analito quando se utilizam métodos cromatográficos, especialmente quando não é possível utilizar um padrão interno adequado.

### 1.2.2. Critérios gerais de desempenho para os métodos de confirmação

#### 1.2.2.1. Veracidade através da recuperação

Para as análises repetidas de um material de referência certificado, o desvio entre o valor médio da fração mássica determinado experimentalmente corrigido em função da recuperação e o valor certificado deve respeitar os intervalos mínimos de veracidade indicados no quadro 1.

Quadro 1

#### Veracidade mínima dos métodos quantitativos

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

Quando não estiverem disponíveis materiais de referência certificados, é aceitável que a veracidade das medições seja avaliada de outras formas, tais como a utilização de materiais com valores atribuídos de estudos interlaboratoriais ou através de adições de quantidades conhecidas do(s) analito(s) a uma matriz em branco.

#### 1.2.2.2. Precisão

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

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

em que C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10 (por exemplo, 1 mg/g = 10<sup>-3</sup>). Para as frações mássicas inferiores a 120 µg/kg, a aplicação da equação de Horwitz resulta em valores inaceitavelmente elevados. Por conseguinte, o coeficiente de variação máximo permitido não deve ser superior aos valores apresentados no quadro 2.

Quadro 2

#### Coefficiente de variação aceitável

Fração mássica	CV em condições de reprodutibilidade (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adaptado da equação de Horwitz)
> 120 µg/kg-1 000 µg/kg	22 (adaptado da equação de Horwitz)
10-120 µg/kg	25 *
< 10 µg/kg	30 *

\* \* O CV (%) apresentado é uma referência e deve ser tão baixo quanto razoavelmente possível.

Para as análises efetuadas em condições de repetibilidade, o coeficiente de variação em condições de repetibilidade deve ser igual ou inferior a dois terços dos valores indicados no quadro 2.

#### 1.2.3. Requisitos para a separação cromatográfica

Para a cromatografia líquida (LC) ou gasosa (GC), o tempo de retenção mínimo aceitável para o(s) analito(s) em estudo deve ser o dobro do tempo de retenção correspondente ao volume morto da coluna. O tempo de retenção do analito no extrato deve corresponder ao do padrão de calibração, de um padrão ajustado em função da matriz ou de um padrão de matriz fortificada, com uma tolerância de ± 0,1 minuto. Para a cromatografia rápida, em que o tempo de retenção é inferior a 2 minutos, é aceitável um desvio inferior a 5% do tempo de retenção. Caso se utilize um padrão interno, o rácio entre o tempo de retenção cromatográfica do analito e o do padrão interno, ou

seja, o tempo de retenção relativa do analito, deve corresponder ao do padrão de calibração, do padrão ajustado em função da matriz ou do padrão de matriz fortificada, com um desvio máximo de 0,5% para a cromatografia gasosa e de 1% para a cromatografia líquida, para os métodos validados a partir da data de entrada em vigor do presente regulamento.

#### 1.2.4. Critérios de desempenho específicos para a espectrometria de massa

##### 1.2.4.1. Detecção por espectrometria de massa

A deteção por espectrometria de massa deve ser efetuada utilizando algumas das seguintes opções:

1. registo de espectros de massa de varrimento total;
2. monitorização seletiva de iões (SIM);
3. técnicas de espectrometria de massa sequencial (MS<sup>n</sup>), como a monitorização seletiva de reações (SRM);
4. uma combinação de técnicas de espectrometria de massa (MS) ou de espectrometria de massa sequencial (MS<sup>n</sup>) com modos de ionização adequados.

Tanto a espectrometria de massa de baixa resolução (LRMS, com uma resolução de uma unidade de massa) como a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), incluindo, por exemplo, instrumentação de setores de dupla focalização, tempo de voo (TOF) e Orbitrap, são adequadas.

Para confirmar a identidade de um analito em espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), o desvio de massa de todos os iões de diagnóstico deve ser inferior a 5 ppm (ou, no caso de  $m/z < 200$ , abaixo de 1 mDa). Com base no que precede, a resolução efetiva deve ser selecionada em função da adequação à sua finalidade e a resolução deve normalmente ser superior a 10 000 para todo o intervalo de massas a 10% do vale ou a 20 000 à largura a meia altura (FWHM).

Quando a determinação por espectrometria de massa é efetuada através do registo de espectros de varrimento total (tanto LRMS como HRMS), só são adequados iões de diagnóstico com uma intensidade relativa superior a 10% no espectro de referência do padrão de calibração, do padrão ajustado em função da matriz ou do padrão de matriz fortificada. Os iões de diagnóstico devem incluir o ião molecular (se presente, a uma intensidade  $\geq 10\%$  do pico de base) e iões fragmentados característicos ou iões-produto.

Seleção de iões precursores: quando a determinação por espectrometria de massa é efetuada por fragmentação após seleção de iões precursores, a seleção de iões precursores é efetuada com uma resolução de uma unidade de massa ou superior. O ião precursor selecionado deve ser o ião molecular, os aductos característicos do ião molecular, os iões-produto característicos ou iões de um dos seus isótopos. Caso a seleção do precursor tenha uma janela de seleção mássica superior a um Dalton (por exemplo, no caso de aquisição independente de dados), a técnica é considerada uma análise de confirmação de varrimento total.

Iões fragmentados e iões-produto: os iões fragmentados ou iões-produto selecionados devem ser iões fragmentados de diagnóstico para o analito/produto medido. Sempre que possível, devem ser omitidas as transições não seletivas (por exemplo, o catião tropílio ou a perda de água). A abundância de iões de diagnóstico deve ser determinada a partir da área ou altura do pico de cromatogramas de iões extraídos integrados. O mesmo se aplica quando são utilizadas medições de varrimento total para efeitos de identificação. A razão sinal/ruído (S/N) de todos os iões de diagnóstico deve ser igual ou superior a três para um (3:1).

Intensidades relativas: as intensidades relativas dos iões de diagnóstico (razão entre iões) são expressas em percentagem da intensidade do ião ou da transição mais abundantes. A razão entre iões deve ser determinada comparando espectros ou integrando os sinais do traçado da massa do ião extraído. A razão entre iões do analito a confirmar deve corresponder à dos padrões ajustados em função da matriz, dos padrões de matriz fortificada ou das soluções padrão a concentrações comparáveis, medidas nas mesmas condições, com um desvio relativo de  $\pm 40\%$ .

Para todas as análises por espectrometria de massa, deve determinar-se pelo menos uma razão entre iões. Devem ser, de preferência, iões obtidos num único varrimento, mas os iões podem também ter origem em diferentes varrimentos na mesma injeção (ou seja, varrimento total e varrimento de fragmentação).

## 1.2.4.2. Identificação

Deve ser utilizado um sistema de pontos de identificação para selecionar modos de aquisição e critérios de avaliação adequados. Para a confirmação da identidade de substâncias numa matriz para as quais está estabelecido um LMR (utilização autorizada), é necessário um mínimo de 4 pontos de identificação. Para as substâncias não autorizadas ou proibidas, são necessários 5 pontos de identificação. Um ponto pode ter origem na separação cromatográfica. O quadro 3 mostra o número de pontos de identificação que cada uma das técnicas produz. A fim de reunir os pontos de identificação exigidos para a confirmação, podem adicionar-se pontos de identificação obtidos a partir de diferentes técnicas.

1. Todas as análises por espectrometria de massa devem ser combinadas com uma técnica de separação que mostre poder de separação e seletividade suficientes para a aplicação específica. Entre as técnicas de separação adequadas contam-se, entre outras, as cromatografias líquida e gasosa, a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia com fluido supercrítico (SFC). No caso de um analito que apresente qualquer composto isobárico ou isomérico, a aceitabilidade do tempo de retenção (ou seja,  $\pm 0,5\%$  em GC e  $\pm 1\%$  em LC e SFC) é obrigatória para confirmar a sua identidade.
2. Pode combinar-se um máximo de três técnicas diferentes para atingir o número mínimo de pontos de identificação.
3. Os diferentes modos de ionização (por exemplo, ionização por eletrões e ionização química) são considerados técnicas diferentes.

Quadro 3

**Pontos de identificação por técnica**

Técnica	Pontos de identificação
Separação (modo GC, LC, SFC, CE)	1
Ião LR-MS	1
Seleção de iões precursores a um intervalo mássico $< \pm 0,5$ Da	1 (indireto)
Ião-produto LR-MS <sup>n</sup>	1,5
Ião HR-MS	1,5
Ião-produto HR-MS <sup>n</sup>	2,5

Quadro 4

**Exemplos do número de pontos de identificação obtidos com técnicas específicas e combinações de técnicas (n = inteiro)**

Técnica(s)	Separação	Número de iões	Pontos de identificação
GC-MS (EI ou CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI e CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI ou CI) 2 derivados	GC	2 (Derivado A) + 2 (Derivado B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- ou LC-MS/MS	GC ou LC	1 precursor + 2 produtos	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
GC- ou LC-MS/MS	GC ou LC	2 precursores + 2 produtos	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
GC- ou LC-MS <sup>3</sup>	GC ou LC	1 precursor + 1 produto MS <sup>2</sup> + 1 produto MS <sup>3</sup>	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- ou LC-HRMS	GC ou LC	n	1 + n × 1,5

GC- ou LC-HRMS/MS	GC ou LC	1 precursor (intervalo mássico $\leq \pm 0,5$ Da) + 1 produto	$1 + 1 + 2,5 = 4,5$
GC- ou LC-HRMS e HRMS/MS	GC ou LC	1 ião varrimento total + 1 ião-produto HRMS <sup>a</sup>	$1 + 1,5 + 2,5 = 5$
GC- e LC-MS	GC e LC	2 iões (GCMS) + 1 ião (LCMS)	$1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6$

<sup>a</sup> Não é obtido qualquer ponto de identificação adicional para a seleção de ião precursor, se esse ião precursor for o mesmo ião (ou um aducto ou isótopo) que o ião HRMS monitorizado em varrimento total.

#### 1.2.5. Critérios de desempenho específicos para a determinação de um analito por cromatografia líquida com técnicas de deteção que não a espectrometria de massa

Apenas no caso das substâncias autorizadas, podem ser utilizadas as seguintes técnicas em alternativa aos métodos baseados na espectrometria de massa, desde que sejam satisfeitos os critérios pertinentes para essas técnicas:

1. espectrofotometria de varrimento total com deteção por um sistema de díodos (DAD) utilizada com HPLC;
2. espectrofotometria com deteção por fluorescência (FLD) no caso de utilização com HPLC.

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

##### 1.2.5.1. Critérios de desempenho para a espectrofotometria de varrimento total com deteção por um sistema de díodos

Devem ser satisfeitos os critérios de desempenho para a separação cromatográfica incluídos no capítulo 1.2.3.

Os máximos de absorção no espectro UV do analito devem ocorrer aos mesmos comprimentos de onda que os do padrão de calibração em matriz, dentro de uma margem máxima que é determinada pela resolução do sistema de deteção. No caso de deteção com sistema de díodos, a margem máxima em causa é, em geral, de  $\pm 2$  nm. Acima de 220 nm, o espectro do analito não deve ser visivelmente diferente do espectro do padrão de calibração nas zonas dos dois espectros com uma absorvância relativa superior ou igual a 10%. Este critério é satisfeito quando, por um lado, se encontram presentes os mesmos máximos e, por outro, quando em nenhum dos pontos 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 oficiais com os da solução de calibração deve exceder um fator crítico de concordância. Este fator deve ser determinado durante o processo de validação para todos os analitos, com base nos espectros para os quais estejam satisfeitos os critérios descritos *supra*. Deve verificar-se a variabilidade dos espectros causada pela matriz da amostra e pelo desempenho do detetor.

##### 1.2.5.2. Critérios de desempenho para a espectrofotometria com deteção por fluorescência

Devem ser satisfeitos os critérios de desempenho para a separação cromatográfica incluídos no capítulo 1.2.3.

A seleção dos comprimentos de onda de excitação e de emissão combinada com as condições cromatográficas deve ser feita de forma a minimizar os efeitos de componentes interferentes em extratos da amostra em branco. Deve haver um mínimo de 50 nanómetros entre os comprimentos de onda de excitação e de emissão.

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

Tal aplica-se a moléculas que exibem fluorescência inata, bem como a moléculas que exibem fluorescência após transformação ou derivação.

## CAPÍTULO 2

## VALIDAÇÃO

## 2.1. Características de desempenho a determinar para os métodos analíticos

Através da validação do método, deve demonstrar-se que o método analítico satisfaz os critérios aplicáveis às características de desempenho pertinentes. Diferentes objetivos de controlo exigem diferentes categorias de métodos. O quadro 5 determina as características de desempenho que devem ser verificadas para cada tipo de método, fornecendo o presente capítulo explicações mais pormenorizadas sobre cada parâmetro.

Quadro 5

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

Método	Confirmação		Triagem		
	Qualitativa	Quantitativa	Qualitativa	Semiquantitativa	Quantitativa
Substâncias	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identificação em conformidade com o ponto 1.2	x	x			
CC $\alpha$	x	x			
CC $\beta$	-		x	x	x
Veracidade		x			x
Precisão		x		(x)	x
Efeito de matriz relativo/ recuperação absoluta *		x			x
Seletividade/especificidade		x	x	x	x
Estabilidade #		x	x	x	x
Robustez		x	x	x	x

x: é necessário provar, através da validação, que os requisitos para a característica de desempenho estão satisfeitos.

(x): os requisitos de precisão do capítulo 1.2.2.2 não precisam de ser satisfeitos no caso dos métodos de triagem semiquantitativos. No entanto, a precisão deve ser determinada para provar que o método é adequado para evitar falsos resultados analíticos conformes.

A: substâncias proibidas ou não autorizadas

B: substâncias autorizadas

# Se os dados de estabilidade relativos a analitos numa matriz estiverem disponíveis em literatura científica ou com origem noutra laboratório, esses dados não precisam de ser novamente determinados pelo laboratório em causa. No entanto, uma referência aos dados de estabilidade disponíveis de analitos em solução só é aceitável se se aplicarem condições idênticas.

\* Pertinente para os métodos MS para provar, através da validação, que estão satisfeitos os requisitos relativos às características de desempenho. O efeito de matriz relativo do método deve ser determinado, sempre que este efeito não tiver sido avaliado durante o procedimento de validação. A recuperação absoluta do método deve ser determinada, sempre que não for utilizado nenhum padrão interno ou nenhuma calibração de matriz fortificada.

## 2.2. Veracidade, repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial

O presente capítulo fornece exemplos e referências para os procedimentos de validação. Podem utilizar-se outras abordagens para demonstrar que o método satisfaz os critérios de desempenho, desde que alcancem o mesmo nível e qualidade de informação.

### 2.2.1. Validação convencional

O cálculo dos parâmetros de acordo com os métodos convencionais requer a realização de diversas experiências isoladas. Cada característica de desempenho deve ser determinada para cada alteração importante (ver secção 2.4). No que respeita aos métodos multianálitos, podem analisar-se vários analitos em simultâneo, desde que se tenham excluído possíveis interferências pertinentes. 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 para a confirmação e o controlo da especificidade).

#### 2.2.1.1. Veracidade com base num material de referência certificado

É preferível determinar a veracidade de um método analítico por meio de material de referência certificado (MRC). O procedimento encontra-se descrito na norma ISO 5725-4:1994 <sup>(2)</sup>.

É apresentado o seguinte exemplo:

1. Analisar seis amostras idênticas do MRC em conformidade com as instruções para o método;
2. Determinar a concentração do analito presente em cada uma das amostras idênticas;
3. Calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) para estas seis amostras idênticas;
4. Calcular a veracidade dividindo a concentração média detetada pelo valor certificado (medido como concentração) e multiplicando por 100, para exprimir o resultado sob a forma de uma percentagem.

Veracidade (%) = (concentração média detetada corrigida com a recuperação) × 100/valor certificado.

#### 2.2.1.2. Veracidade com base em amostras fortificadas

Se não estiver disponível material de referência certificado, a veracidade do método deve ser determinada por experimentação utilizando uma matriz em branco reforçada, no mínimo de acordo com o seguinte esquema:

1. Para os métodos validados a partir da data de entrada em vigor do presente regulamento, seleccionar material em branco e fortificar a uma concentração de:
  - a) 0,5 <sup>(3)</sup>, 1,0 e 1,5 vezes o RTM; ou
  - b) 0,1 <sup>(4)</sup>, 1,0 e 1,5 vezes o LMR ou o LM para as substâncias autorizadas; ou
  - c) 1,0, 2,0 e 3,0 vezes o teor mínimo calibrado (TMC) para as substâncias não autorizadas (para as quais não foi estabelecido nenhum RTM).
2. Para cada nível, a análise deve ser realizada com seis amostras idênticas.
3. Analisar as amostras.
4. Calcular a concentração detetada em cada amostra.
5. Calcular a veracidade de cada amostra utilizando a equação abaixo e, subsequentemente, calcular a veracidade média e o coeficiente de variação para os seis resultados a cada nível de concentração.

Veracidade (%) = (concentração média detetada corrigida com a recuperação) × 100/nível de fortificação.

No caso dos métodos para as substâncias autorizadas validados antes da data de aplicação do presente regulamento, é suficiente determinar a veracidade do método utilizando 6 alíquotas fortificadas a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR ou o LM.

<sup>(2)</sup> ISO 5725-4:2020 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method (Clause 3).

<sup>(3)</sup> Se, para uma substância farmacologicamente ativa não autorizada, a validação de uma concentração de 0,5 vezes o RTM não for razoavelmente possível, a concentração de 0,5 vezes o RTM pode ser substituída pela concentração mais baixa entre 0,5 e 1,0 vezes o RTM, que seja razoável alcançar.

<sup>(4)</sup> Se, para uma substância farmacologicamente ativa específica, a validação de uma concentração de 0,1 vezes o LMR não for razoavelmente possível, a concentração de 0,1 vezes o LMR pode ser substituída pela concentração mais baixa entre 0,1 e 0,5 vezes o LMR, que seja razoável alcançar.

### 2.2.1.3. Repetibilidade

1. Para os métodos validados a partir da data de entrada em vigor do presente regulamento, deve ser preparado um conjunto de amostras de matrizes em branco idênticas da mesma espécie. Devem ser fortificadas com o analito para obter concentrações equivalentes a:
  - a) 0,5 <sup>(5)</sup>, 1,0 e 1,5 vezes o RTM, ou
  - b) 0,1 <sup>(6)</sup>, 1,0 e 1,5 vezes o LMR ou o LM para as substâncias autorizadas, ou
  - c) 1,0, 2,0 e 3,0 vezes o TMC para as substâncias não autorizadas ou proibidas, caso não seja aplicável nenhum RTM.
2. Para cada nível, a análise deve ser realizada com, pelo menos, seis amostras idênticas.
3. Analisar as amostras.
4. Calcular a concentração detetada em cada amostra.
5. Calcular a concentração média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas.
6. Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes.
7. Calcular as médias globais das concentrações, dos desvios-padrão (fazendo a média do desvio-padrão ao quadrado das diferentes medições e calculando a raiz quadrada da mesma) e dos coeficientes de variação para as amostras fortificadas.

No caso dos métodos para as substâncias autorizadas validados antes da data de entrada em vigor do presente regulamento, é suficiente determinar a repetibilidade com matrizes fortificadas em concentrações a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR ou o LM.

Em alternativa, o cálculo da repetibilidade pode ser efetuado de acordo com a norma ISO 5725-2:2019 <sup>(7)</sup>.

### 2.2.1.4. Reprodutibilidade intralaboratorial

1. Para as validações realizadas após a data de entrada em vigor do presente regulamento, preparar um conjunto de amostras de material de ensaio especificado (matrizes idênticas ou diferentes), fortificadas com o(s) analito(s) de modo a obter concentrações equivalentes a:
  - a) 0,5<sup>5</sup>, 1,0 e 1,5 vezes o RTM, ou
  - b) 0,1<sup>6</sup>, 1,0 e 1,5 vezes o LMR ou o LM para as substâncias autorizadas, ou
  - c) 1,0, 2,0 e 3,0 vezes o TMC para as substâncias não autorizadas ou proibidas, caso não seja aplicável um RTM.
2. Efetuar a análise a cada nível de concentração com, pelo menos, seis amostras idênticas de material em branco.
3. Analisar as amostras.
4. Calcular a concentração detetada em cada amostra.

<sup>(5)</sup> Se, para uma substância farmacologicamente ativa não autorizada, a validação de uma concentração de 0,5 vezes o RTM não for razoavelmente possível, a concentração de 0,5 vezes o RTM pode ser substituída pela concentração mais baixa entre 0,5 e 1,0 vezes o RTM, que seja razoável alcançar.

<sup>(6)</sup> Se, para uma substância farmacologicamente ativa específica, a validação de uma concentração de 0,1 vezes o LMR não for razoavelmente possível, a concentração de 0,1 vezes o LMR pode ser substituída pela concentração mais baixa entre 0,1 e 0,5 vezes o LMR, que seja razoável alcançar.

<sup>(7)</sup> ISO 5725-2:2019 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (Clause 3).

5. Repetir estas etapas em, pelo menos, duas outras ocasiões, com lotes diferentes de material em branco, operadores diferentes e o maior número possível de condições ambientais diferentes, por exemplo, lotes diferentes de reagentes, solventes, temperaturas ambientes diferentes, instrumentação diferente ou uma variação de outros parâmetros.
6. Determinar a concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas.

No caso dos métodos para as substâncias autorizadas validados antes da data de entrada em vigor do presente regulamento, é suficiente determinar a reprodutibilidade intralaboratorial com matrizes fortificadas em concentrações a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR ou o LM.

Em alternativa, o cálculo da reprodutibilidade intralaboratorial/precisão intermédia pode também ser efetuado de acordo com as normas ISO 5725-2:2019, ISO 11843-1:1997 <sup>(8)</sup>, Codex CAC/GL 59-2006 <sup>(9)</sup>.

### 2.2.2. Validação em conformidade com modelos alternativos

O cálculo dos parâmetros em conformidade com modelos alternativos exige a realização de um plano experimental. Deve ser concebido um plano experimental em função do número de espécies e fatores diferentes que estão a ser investigados. Assim, a primeira fase de todo o procedimento de validação é ter em conta as populações de amostras que, no futuro, serão analisadas no laboratório, a fim de determinar as espécies e os fatores mais importantes, que poderão influenciar os resultados das medições. A abordagem fatorial permite avaliar a incerteza de medição dos resultados dos ensaios, obtidos numa variedade de condições de ensaio num determinado laboratório, tais como diferentes analistas, instrumentação diferente, diferentes lotes de reagentes, matrizes diferentes, duração dos ensaios diferente e temperaturas diferentes. Subsequentemente, a gama de concentrações tem de ser escolhida de forma adaptada ao objetivo, de acordo com o LMR ou o LM para as substâncias autorizadas, ou o RTM ou o TMC para as substâncias proibidas ou não autorizadas.

A abordagem fatorial visa estabelecer dados de precisão e dados de medição fiáveis através de uma variação simultânea controlada dos fatores selecionados. Permite avaliar o impacto combinado dos efeitos fatoriais e dos efeitos aleatórios. A conceção experimental permite igualmente a investigação da robustez <sup>(10)</sup> do método analítico e a determinação do desvio-padrão da reprodutibilidade interna entre matrizes.

Segue-se um exemplo de abordagem alternativa que utiliza um plano de conceção experimental ortogonal.

Podem ser examinados até sete fatores (fatores de ruído). O estudo foi concebido de modo a que a precisão, a veracidade (com base em amostras fortificadas), a sensibilidade, a incerteza de medição e as concentrações críticas possam ser determinadas simultaneamente através da execução do plano experimental.

### Quadro 6

#### Exemplo de um plano de conceção experimental ortogonal com 7 fatores (I — VII), com variação a dois níveis (A/B), num estudo de validação com oito séries (combinação de nível de fatores)

Fator	I	II	III	IV	V	VI	VII
Série 01	A	A	A	A	A	A	A
Série 02	A	A	B	A	B	B	B
Série 03	A	B	A	B	A	B	B
Série 04	A	B	B	B	B	A	A

<sup>(8)</sup> ISO 11843-1:1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions.

<sup>(9)</sup> Comissão do *Codex Alimentarius*, Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas, Organização Mundial da Saúde, Guidelines on estimation of uncertainty of results (CAC/GL 59-2006).

<sup>(10)</sup> As alterações das condições experimentais referidas neste contexto podem consistir em materiais da amostra, analitos, condições de armazenamento e condições ambientais e/ou de preparação das amostras. 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 variações suscetíveis de afetar o resultado analítico.

Série 05	B	A	A	B	B	A	B
Série 06	B	A	B	B	A	B	A
Série 07	B	B	A	A	B	B	A
Série 08	B	B	B	A	A	A	B

O cálculo das características do método deve ser efetuado conforme descrito por Jülicher *et al.* <sup>(11)</sup>.

### 2.2.3. Outras abordagens da validação

Podem usar-se outras abordagens para demonstrar que o método analítico satisfaz os critérios relativos às características de desempenho, desde que alcancem o mesmo nível e qualidade de informação. A validação pode também ser efetuada através da realização de um estudo interlaboratorial, tal como estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, pela ISO ou pela IUPAC <sup>(12)</sup> ou em conformidade com métodos alternativos como os estudos unilaboratoriais ou a validação interna <sup>(13)</sup>. Sempre que se aplicarem procedimentos de validação alternativos, devem ser estabelecidos no protocolo de validação o modelo e a estratégia subjacentes, juntamente com os respetivos pré-requisitos, pressupostos e fórmulas ou, pelo menos, devem ser fornecidas referências quanto à sua disponibilidade.

### 2.3. Seletividade/Especificidade

Tanto quanto possível, deve determinar-se a capacidade de discriminação entre o analito e as substâncias estreitamente aparentadas. Deve determinar-se a interferência de homólogos, isómeros, produtos de degradação, substâncias endógenas, análogos, metabolitos do resíduo em causa, compostos da matriz ou qualquer outra substância potencialmente interferente e, se necessário, deve alterar-se o método a fim de evitar as interferências identificadas. Para determinar a especificidade do método, deve ser utilizada a seguinte abordagem:

1. Selecionar uma gama de compostos quimicamente relacionados ou outras substâncias suscetíveis de se encontrarem com o composto em causa, que possam estar presentes nas amostras, e verificar se podem interferir com a análise do(s) analito(s) visado(s).
2. Analisar um número adequado de amostras em branco representativas, por exemplo lotes diferentes ou lotes de espécies animais diferentes ( $n \geq 20$ ) e verificar se existem quaisquer interferências de sinais, picos ou vestígios iónicos na zona em que se prevê a eluição do analito visado.
3. Fortificar amostras em branco representativas numa concentração pertinente com substâncias que poderiam eventualmente interferir com a identificação e/ou quantificação do analito e investigar se a substância adicionada:
  - a) Pode conduzir a uma identificação falsa;
  - b) Dificulta a identificação do analito a analisar;
  - c) Influencia apreciavelmente a quantificação.

### 2.4. Robustez

O método analítico deve ser testado para determinar a continuidade do seu desempenho em diferentes condições experimentais, que incluem, por exemplo, condições de amostragem diferentes e pequenas alterações que podem ocorrer nos ensaios de rotina. Para testar a robustez do método, as alterações introduzidas nas condições experimentais devem ser menores. A importância destas alterações deve ser avaliada. Deve determinar-se cada característica de desempenho relativamente a todas as pequenas alterações que tenham comprovadamente um efeito significativo sobre o desempenho do ensaio.

<sup>(11)</sup> 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.

<sup>(12)</sup> IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Applied Chem*, 67, 331.

<sup>(13)</sup> 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.

## 2.5. Estabilidade

Devem determinar-se a estabilidade do padrão de calibração, do padrão ajustado em função da matriz e/ou dos padrões de matriz fortificada e dos constituintes do analito ou da matriz na amostra durante o armazenamento ou a análise, uma vez que as instabilidades podem influenciar os resultados do ensaio.

Geralmente, a estabilidade do analito está bem caracterizada em várias condições de armazenamento. As experiências realizadas para monitorizar as condições de armazenamento de padrões e amostras, que foram realizadas no âmbito da acreditação laboratorial normal e do sistema de controlo da qualidade, podem fornecer as informações necessárias. Se estiverem disponíveis dados de estabilidade para os analitos na matriz (por exemplo, com base nas informações dos LRUE, dados publicados, etc.), estes dados não têm de ser determinados por cada laboratório. No entanto, as referências aos dados de estabilidade disponíveis de analitos em solução e numa matriz só são aceitáveis se se aplicarem condições idênticas.

Caso os dados de estabilidade necessários não estejam disponíveis, devem ser utilizadas as seguintes abordagens:

### 2.5.1. Determinação da estabilidade do analito em solução

1. Preparar uma solução-mãe fresca do(s) analito(s) e diluir tal como especificado nas instruções da análise, de modo a poder preparar alíquotas suficientes (por exemplo, 40) de cada concentração selecionada. As amostras devem ser preparadas em:
  - a) Soluções do analito utilizadas para a fortificação;
  - b) Soluções do analito utilizadas para a análise final;
  - c) Qualquer outra solução com interesse (por exemplo, padrões derivados).
2. Medir o teor do analito na solução recentemente preparada de acordo com as instruções da análise.
3. Colocar volumes adequados em recipientes apropriados, rotular e armazenar de acordo com as condições de luz e temperatura do esquema constante do quadro 7. O tempo de armazenamento deve ser escolhido tendo em conta a prática analítica aplicada, de preferência até serem observáveis os primeiros fenómenos de degradação durante a identificação e/ou a quantificação. Se não se observar qualquer degradação durante o estudo de estabilidade, a duração de armazenamento do estudo de estabilidade deve ser igual à duração do período máximo de armazenamento da solução.
4. Calcular a concentração do(s) analito(s) em cada alíquota em comparação com a concentração do analito na solução recentemente preparada, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Analito restante (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{fresco}}$$

$$C_i = \text{concentração no momento } i$$

$$C_{\text{fresco}} = \text{concentração da solução fresca}$$

O valor médio de cinco soluções idênticas armazenadas não deve diferir mais de 15% do valor médio de cinco soluções idênticas recentemente preparadas. O valor médio das cinco soluções recentemente preparadas deve ser utilizado como base para o cálculo da diferença percentual.

Quadro 7

#### Esquema para a determinação da estabilidade de um analito em solução

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

### 2.5.2. Determinação da estabilidade do(s) analito(s) na matriz

1. Usar amostras reais, sempre que possível. Quando não estiver disponível uma matriz real, deve usar-se uma matriz em branco fortificada com o analito.

2. Se estiver disponível uma matriz real, determinar a sua concentração enquanto a matriz ainda está fresca. Armazenar mais alíquotas da matriz real homogeneizada a uma temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou inferior, se necessário, e determinar as concentrações do analito enquanto a amostra estiver conservada no laboratório.
3. Caso não se encontre disponível uma matriz real, deve tomar-se alguma matriz em branco e homogeneizá-la. Dividir a matriz em cinco alíquotas. Cada alíquota deve ser fortificada com o analito, preparado de preferência numa pequena quantidade de solução aquosa. Analisar uma alíquota imediatamente. Armazenar as alíquotas restantes a uma temperatura de, pelo menos,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou inferior, se necessário, e analisá-las após a armazenagem a curto, médio e longo prazo, tendo em conta os métodos analíticos aplicados.
4. Registrar o tempo de armazenamento máximo aceitável e as condições ótimas de armazenamento.

O valor médio de cinco soluções idênticas armazenadas não deve diferir mais do que a reprodutibilidade intralaboratorial do método em relação ao valor médio de cinco soluções idênticas recentemente preparadas. O valor médio das cinco soluções recentemente preparadas deve ser utilizado como base para o cálculo da diferença percentual.

#### 2.6. Limite de decisão para a confirmação (CC $\alpha$ )

Deve determinar-se o CC $\alpha$  para os métodos de confirmação. O CC $\alpha$  deve ser estabelecido em condições conformes com os requisitos de identificação ou identificação e quantificação definidos em «Critérios de desempenho e outros requisitos para os métodos analíticos», tal como estabelecido no capítulo 1.

Para o controlo da conformidade das amostras, a incerteza de medição-padrão combinada já foi tida em conta no valor CC $\alpha$  (limite de decisão para a confirmação).

1. Para as substâncias farmacologicamente ativas não autorizadas ou proibidas, o CC $\alpha$  deve ser calculado do seguinte modo:
  - a) Método 1: através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843-1:1997 <sup>(14)</sup> (aqui referido como o valor líquido crítico da variável). Neste caso, deve usar-se material em branco, fortificado ao ou acima do RTM ou TMC em passos equidistantes. Analisar as amostras. Após a identificação, representar graficamente o sinal quando possível, ou a concentração recalculada 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 é aplicável apenas aos ensaios quantitativos. Os limites de decisão obtidos com esta abordagem devem ser verificados analisando a matriz em branco fortificada no limite de decisão calculado.
  - b) Método 2: analisando pelo menos 20 materiais em branco representativos por matriz, de modo a poder calcular a razão sinal/ruído no intervalo de tempo em que se espera obter o analito. Pode usar-se como limite de decisão três vezes a razão sinal/ruído. Este método é aplicável tanto a ensaios quantitativos como qualitativos. Os limites de decisão obtidos com esta abordagem devem ser verificados analisando a matriz em branco fortificada no limite de decisão calculado.
  - c) Método 3:  $\text{CC}\alpha = \text{TMC} + k (\text{unilateral}, 99\%) \times \text{incerteza de medição-padrão (combinada) em TMC}$

Para as substâncias farmacologicamente ativas não autorizadas ou proibidas, dependendo da experiência de validação (e dos respetivos graus de liberdade), a distribuição-t pode ser razoavelmente aplicada, ou — se se tomar como base a distribuição de Gauss (unilateral,  $n=\infty$ ) — deve ser utilizado um fator k de 2,33.

A reprodutibilidade e a veracidade intralaboratorial são adequadas para definir a incerteza de medição-padrão (combinada), se a determinação tiver em conta todos os fatores influentes pertinentes.

O método 2 para o cálculo do CC $\alpha$  só pode ser utilizado até 1 de janeiro de 2026 no caso de métodos validados antes da data de entrada em vigor do presente regulamento. Para os métodos validados após a entrada em vigor do presente regulamento, apenas devem ser utilizados os métodos 1 ou 3.

<sup>(14)</sup> ISO 11843-1:1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions.

2. Para as substâncias autorizadas, o CC $\alpha$  deve ser calculado do seguinte modo:

- a) No caso das substâncias autorizadas em combinações matriz/espécie para as quais tenha sido fixado um LMR ou um LM:
  - i) Método 1: através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843-1:1997 (aqui referido como o valor líquido crítico da variável). Neste caso, deve usar-se material em branco, fortificado ao LMR ou ao LM e acima em passos equidistantes. Analisar as amostras. Após a identificação, representar graficamente o sinal, quando possível, ou a concentração recalculada, em função da concentração adicionada. O limite de decisão ( $\alpha = 5\%$ ) é igual à correspondente concentração ao LMR ou ao LM mais 1,64 vezes o desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial ao nível permitido.
  - ii) Método 2:  $CC\alpha = \text{LMR (ou LM)} + k \text{ (unilateral, 95\%)} \times \text{incerteza de medição-padrão (combinada) ao LMR ou ao LM.}$

Para as substâncias autorizadas, dependendo da experiência de validação (e dos respetivos graus de liberdade), a distribuição-t pode ser razoavelmente aplicada, ou — se se tomar como base a distribuição de Gauss (unilateral,  $n=\infty$ ) — deve ser utilizado um fator k de 1,64.

A reprodutibilidade e a veracidade intralaboratorial são adequadas para definir a incerteza de medição-padrão (combinada), se a determinação tiver em conta todos os fatores influentes pertinentes.

No caso das substâncias farmacologicamente ativas para as quais está estabelecido um LMR para a soma de diferentes substâncias, o CC $\alpha$  da substância com a concentração mais elevada na amostra deve ser utilizado como CC $\alpha$  para avaliar a soma das substâncias na amostra medida.

- b) No caso das substâncias autorizadas em combinações matriz/espécie para as quais não tenha sido fixado um LMR, não podem estar presentes resíduos, a menos que tenha sido efetuado um tratamento autorizado em conformidade com o artigo 11.º da Diretiva 2001/82/CE. No que respeita às substâncias autorizadas, para as quais não foi fixado um LMR, deve utilizar-se o LMR em cascata, estabelecido nos termos do Regulamento de Execução (UE) 2018/470 da Comissão <sup>(15)</sup>, para o cálculo do CC $\alpha$ . Deve aplicar-se o método 1 ou 2 do parágrafo anterior, mas o termo «LMR» refere-se a «0,5 vezes o LMR em cascata, com o objetivo de 0,1 vezes o LMR em cascata, sempre que razoavelmente viável».

## 2.7. Capacidade de deteção para a triagem (CC $\beta$ )

Deve determinar-se a CC $\beta$  para os métodos de triagem. A CC $\beta$  deve ser estabelecida como definido em «Critérios de desempenho e outros requisitos para os métodos analíticos», tal como enunciado no capítulo 1 do presente anexo e em conformidade com os requisitos estabelecidos no quadro 5. No entanto, não é necessário aplicar os requisitos de identificação completos aos métodos de triagem (ver 1.2.3, 1.2.4 e 1.2.5).

1. Para as substâncias farmacologicamente ativas não autorizadas ou proibidas, deve ser assegurado um erro máximo  $\beta$  de 5%. A CC $\beta$  deve ser calculada do seguinte modo:
  - a) Método 1: procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843-1:1997 (aqui referido como o valor líquido mínimo detetável da variável). Neste caso, deve ser utilizado material em branco representativo, fortificado ao RTM e abaixo ou, se não tiver sido estabelecido nenhum RTM, em redor da concentração-alvo para a triagem (STC — *screening target concentration*) em passos equidistantes. Analisar as amostras. Representar graficamente o sinal em função da concentração adicionada. A capacidade de deteção é igual à concentração correspondente à STC mais 1,64 vezes o desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial do teor médio medido na STC. A extrapolação muito abaixo do nível mais baixo de fortificação (< 50% do nível mais baixo de fortificação) deve ser confirmada por dados experimentais na fase de validação.
  - b) Método 2: investigação de material em branco fortificado a níveis de concentração iguais ou superiores à STC. Para cada nível de concentração, devem analisar-se 20 amostras em branco fortificadas, a fim de garantir uma base fiável para esta determinação. A capacidade de deteção do método é igual ao nível de concentração no qual apenas se obtém  $\leq 5\%$  de falsos resultados conformes.
  - c) Método 3:  $CC\beta = \text{STC} + k \text{ (unilateral, 95\%)} \times \text{incerteza de medição-padrão (combinada) à STC ou acima.}$

<sup>(15)</sup> Regulamento de Execução (UE) 2018/470 da Comissão, de 21 de março de 2018, que estabelece regras pormenorizadas relativas aos limites máximos de resíduos a ter em conta para efeitos de controlo no caso dos géneros alimentícios derivados de animais tratados na UE nos termos do artigo 11.º da Diretiva 2001/82/CE (JO L 79 de 22.3.2018, p. 16).

Para as substâncias farmacologicamente ativas não autorizadas ou proibidas, dependendo da experiência de validação (e dos respetivos graus de liberdade), a distribuição-t pode ser razoavelmente aplicada, ou se se tomar como base a distribuição de Gauss (unilateral,  $n=\infty$ ), deve ser utilizado um fator k de 1,64.

A reprodutibilidade e a veracidade intralaboratorial são adequadas para definir a incerteza de medição-padrão (combinada), se a determinação tiver em conta todos os fatores influentes pertinentes.

2. Para as substâncias autorizadas, deve ser assegurado um erro máximo  $\beta$  de 5%. A  $CC\beta$  deve ser calculada do seguinte modo:

a) Método 1: através do procedimento da curva de calibração de acordo com a norma ISO 11843-1:1997 (aqui referido como o valor líquido mínimo detetável da variável). Neste caso, deve ser utilizado material em branco representativo, fortificado ao nível e abaixo do limite permitido, a partir da STC em passos equidistantes. Analisar as amostras e identificar o(s) analito(s). Calcular o desvio-padrão do teor médio medido na STC.

A capacidade de deteção é igual à concentração correspondente à STC mais 1,64 vezes o desvio-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial do teor médio medido na STC.

b) Método 2: através da investigação de material em branco fortificado a níveis de concentração inferiores ao limite permitido. Para cada nível de concentração, devem analisar-se 20 amostras em branco fortificadas, a fim de garantir uma base fiável para esta determinação. A capacidade de deteção do método é igual ao nível de concentração no qual apenas se obtém  $\leq 5\%$  de falsos resultados conformes.

c) Método 3:  $CC\beta = STC + k$  (unilateral, 95%)  $\times$  incerteza de medição-padrão (combinada) à STC ou acima.

Para as substâncias autorizadas, dependendo da experiência de validação (e dos respetivos graus de liberdade), a distribuição-t pode ser razoavelmente aplicada ou, se se tomar como base a distribuição de Gauss (unilateral,  $n=\infty$ ), deve ser utilizado um fator k de 1,64 (mediante seja a utilização em cascata, seja a utilização regular do LMR).

A reprodutibilidade e a veracidade intralaboratorial são adequadas para definir a incerteza de medição-padrão (combinada), se a determinação tiver em conta todos os fatores influentes pertinentes.

No caso das substâncias farmacologicamente ativas para as quais está estabelecido um LMR para a soma de diferentes substâncias, a  $CC\beta$  da substância com a concentração mais elevada na amostra deve ser utilizada como  $CC\beta$  para avaliar a soma das substâncias na amostra medida.

## 2.8. Curvas de calibração

Quando as curvas de calibração são usadas para quantificação:

- 1) Na construção da curva devem usar-se, pelo menos, cinco níveis (incluindo o nível zero) de preferência equidistantes;
- 2) Deve descrever-se o intervalo de trabalho da curva de calibração;
- 3) Deve indicar-se a equação da curva e o grau de ajuste dos dados (coeficiente de determinação  $R^2$ ) à curva;
- 4) Devem mencionar-se os intervalos de aceitabilidade dos parâmetros da curva.

No caso das curvas de calibração baseadas numa solução-padrão, devem ser indicadas gamas aceitáveis de padrões ajustados em função da matriz ou de padrões de matriz fortificada para os parâmetros da curva de calibração, que podem variar de série para série.

## 2.9. Recuperação absoluta

A recuperação absoluta do método deve ser determinada, sempre que não for utilizado nenhum padrão interno ou nenhuma calibração de matriz fortificada.

Se estiverem satisfeitos os requisitos de veracidade estabelecidos no quadro 1, pode ser utilizado um fator de correção fixo. Caso contrário, deve ser utilizado o fator de recuperação obtido para esse lote específico. Em alternativa, deve utilizar-se o procedimento de adição <sup>(16)</sup> de padrão ou um padrão interno em vez de utilizar um fator de correção da recuperação.

A recuperação absoluta deve ser calculada para, pelo menos, seis lotes de matriz representativos.

Antes da extração, uma alíquota da matriz em branco deve ser fortificada com o analito e, após a preparação da amostra, uma segunda alíquota da matriz em branco deve ser fortificada a um nível de concentração pertinente, devendo determinar-se a concentração do analito.

A recuperação deve ser calculada do seguinte modo:

$$\text{Rec (analito)} = (\text{padrão de matriz fortificada}) / (\text{padrão ajustado em função da matriz}) \times 100$$

## 2.10. Efeitos de matriz relativos

O efeito de matriz relativo deve ser determinado em todos os casos. Tal pode ser efetuado quer como parte da validação quer em experiências separadas. O cálculo do efeito de matriz relativo deve ser efetuado para, pelo menos, 20 lotes em branco diferentes (matriz/espécie), de acordo com o âmbito do método, por exemplo, diferentes espécies a abranger.

Após a extração, a matriz em branco deve ser fortificada com o analito ao RTM, LMR ou LM e deve ser analisada juntamente com uma solução pura do analito.

O efeito de matriz relativo ou o fator de matriz (MF — *matrix factor*) é calculado do seguinte modo:

$$\text{MF (standard)} = \frac{\text{peak area of MMS standard}}{\text{peak area of solution standard}}$$

$$\text{MF (IS)} = \frac{\text{peak area of MMS IS}}{\text{peak area of solution IS}}$$

$$\text{MF (standard normalised for IS)} = \frac{\text{MF (standard)}}{\text{MF (IS)}}$$

IS: padrão interno (*internal standard*)

MMS: padrão ajustado em função da matriz (*matrix-matched standard*)

O coeficiente de variação não deve ser superior a 20% para o MF (padrão normalizado para o IS).

## CAPÍTULO 3

### CONTROLO DA QUALIDADE DURANTE AS ANÁLISES DE ROTINA — VERIFICAÇÃO CONTÍNUA DO DESEMPENHO DO MÉTODO

Devem ser satisfeitos os requisitos que garantem a qualidade dos resultados analíticos constantes do capítulo 7.7 da norma ISO/IEC 17025:2017 <sup>(17)</sup>.

Durante as análises de rotina, a análise de materiais de referência certificados (MRC) é a opção preferível para fornecer provas do desempenho do método. Uma vez que os MRC que contêm os analitos pertinentes aos níveis de concentração requeridos raramente estão disponíveis, também podem ser utilizados, em alternativa, materiais de referência fornecidos e caracterizados pelos LRUE ou pelos laboratórios que possuam uma acreditação ISO/IEC 17043:2010 <sup>(18)</sup>. Em alternativa, podem ainda ser utilizados outros materiais de referência internos que sejam controlados regularmente.

A verificação contínua do desempenho do método durante as análises de rotina deve ser efetuada na fase de triagem e na fase de confirmação.

<sup>(16)</sup> A quantidade de padrão de analito adicionada pode ser, por exemplo, entre duas e cinco vezes a quantidade estimada de analito na amostra. Este procedimento destina-se a determinar o teor de um analito numa amostra, tendo em conta a recuperação do processo analítico.

<sup>(17)</sup> ISO/IEC 17025:2017 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (capítulo 7.7).

<sup>(18)</sup> ISO/IEC 17043:2010 Avaliação da conformidade — Requisitos gerais para ensaios de aptidão.

#### 1. Para a fase de triagem:

Para cada série (lote) de análises efetuadas, deve ser simultaneamente analisado um conjunto das seguintes amostras de controlo de qualidade:

- a) Amostra de controlo da adequação do instrumento ao sistema, de preferência específica para o método;
- b) Amostras de controlo da qualidade fortificadas a uma concentração próxima da STC e, de preferência, à  $CC\beta$  de triagem para as substâncias farmacologicamente ativas autorizadas, bem como para as substâncias proibidas ou não autorizadas;
- c) Amostra de controlo conforme (amostras em branco) e, quando pertinente, amostras de reagente em branco.

#### 2. Para a fase de confirmação:

Para cada série (lote) de análises efetuadas, deve ser simultaneamente analisado um conjunto das seguintes amostras de controlo de qualidade:

- a) Amostra de controlo da adequação do instrumento ao sistema, de preferência específica para o método;
- b) Amostras de controlo da qualidade fortificadas a uma concentração próxima do LMR ou do LM para as substâncias farmacologicamente ativas autorizadas ou próxima do RTM ou do TMC para as substâncias proibidas ou não autorizadas (amostras de controlo não conformes);
- c) Amostra de controlo conforme (amostras em branco) e, quando pertinente, amostras de reagente em branco.

Recomenda-se a seguinte ordem para as amostras de controlo da qualidade: amostra de controlo da adequação do instrumento ao sistema, amostra de controlo conforme, amostra(s) a confirmar, novamente amostra de controlo conforme e amostra de controlo da qualidade fortificada (amostras de controlo não conformes).

No caso dos métodos quantitativos, para cada lote de amostras oficiais, deve ser analisada e medida uma curva de calibração antes ou depois das amostras acima elencadas.

Sempre que possível, deve avaliar-se a veracidade (com base em amostras fortificadas) de todos os analitos visados nas amostras de controlo não conformes por meio de gráficos de controlo da qualidade em conformidade com o capítulo 7.7 da norma ISO/IEC 17025:2017. Se tal exigir um número desproporcionadamente elevado de determinações da veracidade, o número de analitos pode ser reduzido a um número de analitos representativos.

## CAPÍTULO 4

### **ALARGAMENTO DO ÂMBITO VALIDADO DE UM MÉTODO PREVIAMENTE VALIDADO**

Por vezes, é necessário alargar o âmbito de um método que foi previamente validado de forma abrangente. Nestes casos, o alargamento do âmbito deve ser realizado de forma eficiente e analiticamente correta. Este objetivo pode ser alcançado mediante a validação de um número reduzido de amostras (por exemplo, metade do número de amostras) em comparação com uma validação completa.

No entanto, o tipo e número de alterações a validar num único sistema de validação reduzido devem basear-se sempre em conhecimentos especializados e em experiências anteriores, por exemplo, uma alteração na técnica de deteção exigiria, em qualquer caso, uma validação completa.

Em geral, a fim de assegurar que a validade do método se mantém, o seu desempenho deve ser monitorizado continuamente e comparado com os parâmetros de validação inicialmente obtidos. De preferência, este controlo contínuo do desempenho do método é concebido de modo a que os dados em falta para uma validação completa possam ser recolhidos ao longo do tempo (por exemplo, com alguns pontos de dados provenientes de amostras de controlo da qualidade em cada série analítica).

#### **4.1. Alargamentos dos métodos no que diz respeito à gama de concentrações**

Devido a alterações dos LMR, dos LM e dos RTM, pode ser necessário ajustar a gama de concentração para a qual um método está validado. Nesse caso, a aplicação de um sistema de validação reduzido é aceitável.

As curvas de calibração para a gama alterada devem ser preparadas de acordo com o procedimento validado. Devem ser analisados diferentes lotes fortificados a diferentes níveis de concentração (ver 2.2.1, 2.2.2). A veracidade, a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratorial/precisão intermédia deverão situar-se dentro de um intervalo aceitável em comparação com as do método inicialmente validado. Se for caso disso, deve efetuar-se um novo cálculo da  $CC\beta$  (métodos de triagem) e do  $CC\alpha$  (métodos de confirmação).

#### 4.2. **Alargamentos dos métodos no que diz respeito a substâncias adicionais**

De um modo geral, o alargamento do método a compostos adicionais só é possível para os analitos que são similares, em termos de estrutura e características, aos já incluídos no método analítico. Nesse caso, a aplicação de um sistema de validação reduzido é aceitável. Do mesmo modo, não é permitida qualquer divergência em relação à descrição do método.

As curvas de calibração das substâncias adicionais devem ser preparadas de acordo com o procedimento validado. Devem ser analisados diferentes lotes de matriz fortificada a diferentes níveis de concentração (ver 2.2.1, 2.2.2). A veracidade, a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratorial/precisão intermédia devem situar-se dentro de um intervalo comparável em relação às dos outros analitos do método inicialmente validado e estar em conformidade com os requisitos estabelecidos no ponto 1.2.2. Deve ser efetuado um cálculo da  $CC\beta$  (métodos de triagem) e do  $CC\alpha$  (métodos de confirmação) para os novos analitos.

#### 4.3. **Alargamentos dos métodos no que diz respeito a matrizes/espécies**

A inclusão de novas matrizes ou espécies num método analítico já validado deve ser sempre uma decisão caso a caso, com base nos conhecimentos e na experiência adquirida até à data com o método e em experiências preliminares para avaliar os potenciais efeitos de matriz e as interferências. Em geral, tal só será possível para as matrizes que apresentem propriedades similares e para os analitos não críticos (estabilidade, detetabilidade).

As curvas de calibração (padrão ou matriz) devem ser preparadas de acordo com o procedimento validado. Devem ser analisados diferentes lotes de matriz fortificada a diferentes níveis de concentração (ver 2.2.1, 2.2.2). A veracidade, a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratorial/precisão intermédia devem situar-se dentro de um intervalo aceitável em relação às do método inicialmente validado e estar em conformidade com os requisitos estabelecidos no ponto 1.2.2. Dependendo da abordagem de validação, poderá ser necessário um novo cálculo da  $CC\beta$  (métodos de triagem) ou do  $CC\alpha$  (métodos de confirmação).

Se os resultados não se situarem dentro de um intervalo aceitável em relação aos valores da matriz original, será necessária uma validação completa adicional, a fim de determinar os parâmetros de desempenho específicos da matriz/espécie.

Nos casos em que os LMR para uma determinada substância diferem para determinadas matrizes, será muito provavelmente difícil adaptar o âmbito do método à matriz/espécie e à concentração adicionais, uma vez que, neste caso, têm de ser consideradas duas alterações. Nesses casos, recomenda-se uma validação completa.

---

## ANEXO II

**PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM E TRATAMENTO OFICIAL DAS AMOSTRAS****1. Quantidade de amostra**

As quantidades mínimas de amostra devem ser definidas no programa nacional de controlo de resíduos. As quantidades mínimas de amostra devem ser suficientes para permitir que os laboratórios aprovados realizem os procedimentos analíticos necessários para completar as análises de triagem e de confirmação. Especificamente para aves de capoeira, aquicultura, coelhos, caça de criação, répteis e insetos, a amostra consiste em um ou mais animais, dependendo dos requisitos dos métodos analíticos. No caso dos ovos, a dimensão da amostra será de, pelo menos, 12 ovos ou mais, em função dos métodos analíticos utilizados. Caso seja necessário analisar várias categorias de substâncias numa única amostra utilizando diferentes métodos analíticos, a dimensão da amostra deve ser aumentada em conformidade.

**2. Divisão em subamostras**

Exceto se tal não for tecnicamente possível ou não for exigido pela legislação nacional, cada amostra deve ser dividida em, pelo menos, duas subamostras equivalentes, de forma que cada uma delas possa ser submetida ao procedimento analítico completo. A subdivisão das amostras pode ter lugar no ponto de colheita ou no laboratório.

**3. Rastreabilidade**

Cada amostra deve ser colhida de modo a que seja sempre possível rastreá-la até à exploração de origem, ao lote de animais ou a cada animal, quando pertinente. Em especial, no caso do leite, de acordo com a escolha do Estado-Membro, as amostras podem ser colhidas num dos seguintes locais:

1. no depósito de recolha da exploração;
2. na unidade industrial, antes de o leite ser descarregado.

**4. Recipientes para as amostras**

As amostras devem ser colocadas em recipientes adequados que permitam manter a sua integridade e identificar a sua origem. Em especial, os contentores devem impedir a substituição, a contaminação cruzada e a degradação. Os recipientes devem ser oficialmente selados.

**5. Relatório de amostragem**

Será elaborado um relatório de todos os procedimentos de amostragem.

O inspetor insere nesse relatório, pelo menos, os seguintes elementos:

1. o endereço das autoridades competentes;
2. o nome do inspetor ou o código de identificação;
3. o número de código oficial da amostra;
4. a data da amostragem;
5. o nome e o endereço do proprietário ou da pessoa responsável pelos animais ou pelos produtos de origem animal;
6. o nome e o endereço da exploração de origem dos animais (quando se tratar de uma amostragem na exploração);
7. o número de registo do estabelecimento/número do matadouro;
8. a identificação dos animais ou dos produtos;
9. a espécie animal;
10. a matriz das amostras;
11. quando pertinente, os medicamentos administrados nas quatro semanas anteriores à amostragem (quando se tratar de uma amostragem na exploração);
12. a substância ou os grupos de substâncias a submeter a pesquisa analítica;
13. observações especiais.

Em função do procedimento de amostragem, devem ser fornecidas cópias do relatório em papel ou em formato eletrónico. O relatório de amostragem e respetivas cópias devem ser preenchidos de forma a garantir a sua autenticidade e validade legal, o que pode exigir que esses documentos sejam assinados pelo inspetor. No caso de a amostragem ter lugar numa exploração, o criador ou seu representante poderá ser convidado a assinar o original do relatório.

O original do relatório de amostragem fica na posse da autoridade competente, que zelará por que pessoas não autorizadas a ele não tenham acesso.

Se necessário, o criador ou o proprietário do estabelecimento pode ser informado da amostragem efetuada.

#### **6. Relatório de amostragem para o laboratório**

O relatório de amostragem para o laboratório estabelecido pelas autoridades competentes deve estar em conformidade com os requisitos estabelecidos no capítulo 7 da norma ISO/IEC 17025:2017 <sup>(1)</sup> e conter, pelo menos, as seguintes informações:

1. o endereço das autoridades competentes ou dos organismos designados;
2. o nome do inspetor ou o código de identificação;
3. o número de código oficial da amostra;
4. a data da amostragem;
5. a espécie animal;
6. a matriz das amostras;
7. as substâncias ou os grupos de substâncias a submeter a pesquisa analítica;
8. observações especiais.

O relatório de amostragem para o laboratório deve acompanhar a amostra, quando esta for enviada ao laboratório.

#### **7. Transporte e armazenamento**

Os planos de controlo de resíduos devem especificar as condições de transporte e armazenamento adequadas para cada combinação analito/matriz, de modo a garantir a estabilidade dos analitos e a integridade das amostras. O tempo de transporte deve ser o mais curto possível e a temperatura durante o transporte deve ser adequada para garantir a estabilidade do analito.

Deve ser dada uma atenção especial às caixas de transporte, à temperatura e ao prazo de entrega ao laboratório responsável.

Em caso de qualquer não conformidade com os requisitos do programa de controlo, o laboratório deve informar de imediato a autoridade competente.

---

<sup>(1)</sup> ISO/IEC 17025:2017 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (capítulo 7.7).