Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

►**B**

DIRECTIVA 2002/69/CE DA COMISSÃO

de ►C1 30 de Julho de 2002 ◄

que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial das dioxinas e a determinação de PCB sob a forma de dioxina nos géneros alimentícios

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(JO L 209 de 6.8.2002, p. 5)

Rectificada por:

►**C1** Rectificação, JO L 252 de 20.9.2002, p. 40 (2002/69/CE)

▼B

DIRECTIVA 2002/69/CE DA COMISSÃO

de ►C1 30 de Julho de 2002 ◄

que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial das dioxinas e a determinação de PCB sob a forma de dioxina nos géneros alimentícios

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 85/591/CEE do Conselho, de 20 de Dezembro de 1985, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo dos géneros destinados à alimentação humana [1], ►C1 e, nomeadamente, os seus artigos 1.º e 4.º ◄,

Considerando o seguinte:

(1) O Regulamento (CE) n.º 466/2001 da Comissão [2], com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 563/2002 [3], e alterado pelo Regulamento (CE) n.º 2375/2001 do Conselho [4], estabelece limites máximos para as dioxinas e os furanos presentes em determinados géneros alimentícios.

(2) A Directiva 89/397/CEE do Conselho, de 14 de Junho de 1989, relativa ao controlo oficial dos géneros alimentícios [5], estabelece os princípios gerais para a realização do controlo dos géneros alimentícios. A Directiva 93/99/CEE do Conselho, de 29 de Outubro de 1993, relativa a medidas adicionais respeitantes ao controlo oficial dos géneros alimentícios [6], introduz um sistema de padrões de qualidade para os laboratórios encarregues pelos Estados-Membros do controlo oficial dos géneros alimentícios.

(3) A Directiva 85/591/CEE estabeleceu critérios gerais para os métodos de amostragem e análise. No entanto, em determinados casos, torna-se necessário estabelecer critérios e/ou requisitos mais específicos que o método de análise deverá respeitar por forma a garantir que os laboratórios utilizam métodos de análise com níveis de desempenho comparáveis.

(4) As disposições relativas à amostragem e aos métodos de análise foram elaboradas com base nos conhecimentos actuais e podem ser adaptadas para ter em conta a evolução dos conhecimentos científicos e tecnológicos.

(5) As disposições definidas na presente directiva referem-se exclusivamente à amostragem e à análise de dioxinas e de dioxinas sob a forma de PCB em aplicação do Regulamento (CE) n.º 466/2001 e não afectam a estratégia, os níveis e a frequência da amostragem, tal como especificado nos anexos III e IV da Directiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos, e revogam as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE [7]. Não afectam os critérios de determinação dos alvos da amostragem, tal como definido na 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

---

[1] JO L 372 de 31.12.1985, p. 50.
[2] JO L 77 de 16.3.2001, p. 1.
[3] JO L 86 de 3.4.2002, p. 5.
[4] JO L 321 de 6.12.2001, p. 1.
[5] JO L 186 de 30.6.1989, p. 23.
[6] JO L 290 de 24.11.1993, p. 14.
[7] JO L 125 de 23.5.1996, p. 10.

▼B

determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos ([1]).

(6) Proceder-se-á a uma abordagem activa, a fim de se obterem dados fiáveis e completos sobre a presença de PCB sob a forma de dioxina em géneros alimentícios. Devem, portanto, estabelecer-se requisitos respeitantes aos métodos de análise a utilizar na determinação de PCB sob a forma de dioxina em géneros alimentícios.

(7) Poder-se-ia utilizar um método de análise de pré-selecção com validação provada e amplamente aceitável bem como com rendimento elevado para seleccionar as amostras com níveis significativos de dioxinas. Os níveis de dioxinas nestas amostras necessitam, depois, de ser determinados por um método de análise de confirmação. Considera-se, assim, adequado estabelecer requisitos rigorosos para os métodos de análise de confirmação e requisitos mínimos para o método de pré-selecção.

(8) As medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

Os Estados-Membros garantirão que a amostragem destinada ao controlo oficial dos níveis de dioxinas e furanos e à determinação dos níveis de PCB sob a forma de dioxina presentes nos géneros alimentícios será realizada em conformidade com os métodos descritos no anexo I.

Artigo 2.º

Os Estados-Membros garantirão que a preparação das amostras e os métodos de análise utilizados no controlo oficial dos níveis de dioxinas e furanos e na determinação dos níveis de PCB sob a forma de dioxina presentes nos géneros alimentícios respeitarão os critérios descritos no anexo II.

Artigo 3.º

Os Estados-Membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva, o mais tardar, até 28 de Fevereiro de 2003. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Sempre que os Estados-Membros adoptarem tais disposições, estas deverão incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. Os Estados-Membros deverão adoptar as modalidades dessa referência.

Artigo 4.º

A presente directiva entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

Artigo 5.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

([1]) JO L 65 de 5.3.1998, p. 31.

▼B

ANEXO I

MÉTODOS DE AMOSTRAGEM DESTINADOS AO CONTROLO OFICIAL DOS NÍVEIS DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) E À DETERMINAÇÃO DE PCB SOB A FORMA DE DIOXINA EM DETERMINADOS GÉNEROS ALIMENTÍCIOS

1. **Objectivo e âmbito de aplicação**

As amostras destinadas ao controlo oficial dos níveis do teor em dioxinas (PCDD/PCDF), bem como à determinação do teor em PCB sob a forma de dioxina [1] nos géneros alimentícios serão colhidas em conformidade com os métodos descritos *infra*. As amostras globais assim obtidas serão consideradas representativas dos lotes ou sublotes dos quais foram colhidas. A observância dos níveis máximos estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 466/2001 da Comissão que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, será estabelecida em função dos níveis determinados nas amostras de laboratório.

[1] Quadro: «WHO TEFs for human risk assessement based on the conclusions of the World Health Organitation meeting in Stockolm». (Factores de equivalência de toxicidadeY da OMS para avaliação do risco para o ser humano nas conclusões da reunião da Organização Mundial de Saúde realizada em Estocolmo), Suécia, de 15 a 18 de Junho de 1997 (Van den Berg et al.,(1998). «Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs,PCDFs for Human and Wildlife» [Factores de equivalência de toxicidade (FET) para PCB, PCDD e PCDF para seres humanos e fauna selvagem]. *Environmental Health Perspectives, 106(12), 775*.

Congéneres	Valor de FET
Dibenzo-p-dioxinas policloradas («PCDD»)	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0001
Dibenzofuranos policlorados («PCDF»)	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,0001
PCB «sob a forma de dioxina» **PCB não-orto + PCB mono-orto**	
PCB não-orto	
PCB 77	0,0001
PCB 81	0,0001
PCB 126	0,1
PCB 169	0,01
PCB mono-orto	
PCB 105	0,0001
PCB 114	0,0005
PCB 118	0,0001
PCB 123	0,0001
PCB 156	0,0005
PCB 157	0,0005
PCB 167	0,00001
PCB 189	0,0001

Abreviaturas utilizadas: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = octo; CDD = dibenzo-p-dioxinas cloradas; CDF = clorodibenzofurano; CB = clorobifenilo.

▼B

2. **Definições**

«Lote»: quantidade de alimentos identificável, entregue de uma vez, que apresenta, conforme estabelecido pelo agente responsável, características comuns tais como a origem, a variedade, o tipo de embalagem, o embalador, o expedidor ou a marcação. No caso do peixe e dos produtos da pesca, deve também ser comparável o seu tamanho.

«Sublote»: parte designada de um grande lote para aplicação do método de amostragem a essa parte designada. Cada sublote deve ser fisicamente separado e identificável.

«Amostra elementar»: quantidade de material colhido num só ponto do lote ou sublote.

«Amostra global»: a totalidade das amostras elementares colhidos no lote ou sublote.

«Amostra de laboratório»: uma parte/quantidade representativa da amostra global destinada ao laboratório.

3. **Disposições gerais**

3.1. *Pessoal*

A amostragem deve ser efectuada por uma pessoa autorizada e qualificada para esse efeito, segundo as disposições vigentes nos Estados-Membros.

3.2. *Material a amostrar*

Todos os lotes a analisar devem ser amostrados separadamente.

3.3. *Precauções a adoptar*

Durante a amostragem e a preparação das amostras de laboratório, devem ser tomadas precauções para evitar qualquer alteração que possa afectar o teor de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina, afectar negativamente a determinação analítica ou tornar não representativas as amostras globais.

3.4. *Amostras elementares*

As amostras elementares devem ser colhidas em diversos pontos do lote ou sublote, desde que tal seja possível na prática. Todas as derrogações a este procedimento devem ser assinaladas no registo previsto no ponto 3.8.

3.5. *Preparação da amostra global*

A amostra global é obtida através da junção de todas as amostras elementares. Deverá pesar, no mínimo, 1 kg, a menos que tal não seja prático, por exemplo, quando a amostra tiver sido colhida de uma única embalagem.

3.6. *Subdivisão da amostra global em amostras de laboratório para efeitos de medidas executórias, de direito de recurso e de procedimentos de arbitragem*

As amostras de laboratório destinadas a medidas executórias, a fins comerciais (direito de recurso) ou a procedimentos de arbitragem são colhidas da amostra global homogeneizada, a menos que esse processo não esteja em conformidade com as disposições jurídicas em vigor nos Estados-Membros em matéria de amostragem. A dimensão das amostras de laboratório para efeitos de medidas executórias deverá ser de ordem a permitir, no mínimo, análises em duplicado.

3.7. *Acondicionamento e envio das amostras globais e de laboratório*

Colocar cada amostra global e de laboratório num recipiente limpo, de material inerte, protegendo-a adequadamente de qualquer possível contaminação, perda de analitos por adsorção na parede interna do recipiente ou dano durante o transporte. Tomar todas as precauções necessárias para evitar qualquer modificação da composição das amostras global e de laboratório que possa ocorrer durante o transporte ou a armazenagem.

3.8. *Selagem e rotulagem das amostras global e de laboratório*

Cada amostra oficial será selada no local de colheita e identificada segundo as prescrições em vigor nos Estados-Membros. Para cada amostragem, elaborar um registo que permita identificar sem ambiguidade o lote amos-

▼B

trado e indicar a data e o local de amostragem, bem como qualquer informação suplementar que possa ser útil ao analista.

4. **Planos de amostragem**

O método de amostragem aplicado deve garantir que a amostra global é representativa do lote a controlar.

Número de amostras elementares

No caso do leite e dos óleos, relativamente aos quais se pode pressupor uma distribuição homogénea dos contaminantes em questão dentro de um determinado lote, basta colher três amostras elementares por lote que constitui a amostra global. Dever-se-á fazer referência ao número do lote. Em relação a outros produtos, o número mínimo de amostras elementares a colher do lote deve ser o referido no quadro 1.

A amostra global, proveniente da junção de todas as amostras elementares, deve ser, no mínimo, de 1 kg (veja-se o ponto 3.5). As amostras elementares deverão ser de peso semelhante. O peso de uma amostra elementar deve ser, no mínimo, de 100 gramas. O peso da amostra elementar depende da dimensão das partículas do lote. Todas as derrogações a este procedimento devem ser assinaladas no registo previsto no ponto 3.8. Em conformidade com as disposições da Decisão 97/747/CE da Comissão, de 27 de Outubro de 1997, que fixa o nível e a frequência de amostragem previstos pela Directiva 96/23/CE do Conselho para a pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos em certos produtos de origem animal [1], a dimensão da amostra para ovos de galinhas poedeiras é de, pelo menos, 12 ovos (para lotes por grosso e para lotes constituídos por embalagens individuais; ver quadros 1 e 2).

QUADRO 1

Número mínimo de amostras elementares a colher do lote

Peso do lote (em kg)	Número mínimo de amostras elementares a colher
< 50	3
50 a 500	5
> 500	10

Caso o lote seja constituído por embalagens individuais, o número de embalagens a colher para formar a amostra global é o que consta do quadro 2.

QUADRO 2

Número de embalagens (amostras elementares) a colher para formar a amostra global caso o lote seja constituído por embalagens individuais

Número de embalagens ou unidades no lote	Número de embalagens ou unidades a colher
1 a 25	1 embalagem ou unidade
26 a 100	cerca de 5 %, com um mínimo de 2 embalagens ou unidades
> 100	cerca 5 %, com um máximo de 10 embalagens ou unidades

5. **Conformidade do lote ou do sublote com a especificação**

O laboratório de controlo deve analisar em duplicado a amostra de laboratório para efeitos de medidas executórias, caso o resultado obtido na primeira análise seja inferior ou superior em menos de 20 % ao nível máximo, calculando a média dos resultados. O lote será aceite se o resul-

[1] JO L 303 de 6.11.1997, p. 12.

▼B

tado da primeira análise for inferior em mais de 20 % ao nível máximo respectivo ou, quando a análise em duplicado for necessária, se a média estiver conforme ao nível máximo respectivo, tal com fixado no Regulamento (CE) n.º 466/2001.

▼B

ANEXO II

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E REQUISITOS RESPEITANTES AOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS NO CONTROLO OFICIAL DOS NÍVEIS DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) E NA DETERMINAÇÃO DE PCB SOB A FORMA DE DIOXINA EM DETERMINADOS GÉNEROS ALIMENTÍCIOS

1. **Objectivo e âmbito de aplicação**

Estes requisitos devem ser aplicados quando se analisam géneros alimentícios, tendo em vista o controlo oficial dos níveis de dioxinas [dibenzo-p--dioxinas policloradas (PCDD) e dibenzofuranos policlorados (PCDF)] e a determinação de PCB sob a forma de dioxina.

A monitorização da presença de dioxinas em géneros alimentícios pode ser realizada mediante uma estratégia que englobe um método de pré-selecção, a fim de escolher as amostras com níveis de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina que sejam 30 a 40 % inferiores ao nível requerido ou o excedam. É necessário que a concentração de dioxinas naquelas amostras com níveis significativos seja determinado/confirmado por um método de confirmação.

Os métodos de pré-selecção são métodos utilizados na detecção da presença de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina ao nível de interesse. Estes métodos têm a capacidade para processar um elevado número de amostras e são utilizados para seleccionar grandes números de amostras potencialmente positivas. São concebidos especificamente para evitar a obtenção de falsos negativos.

Os métodos de confirmação são métodos que fornecem informação completa ou complementar que permitem a identificação e quantificação inequívocas ao nível requerido de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina.

2. **Antecedentes**

Uma vez que as amostras ambientais e biológicas (incluindo as amostras de géneros alimentícios) contêm, regra geral, misturas complexas de diferentes congéneres de dioxinas, introduziu-se o conceito de factores de equivalência de toxicidade (TEF) para facilitar a avaliação dos riscos. Estes TEF foram estabelecidos para exprimir concentrações de misturas de PCDD e PCDF substituídos nas posições 2,3,7 e 8 e, mais recentemente, alguns PCB não-orto e mono-orto com substituição de cloro que possui uma actividade sob a forma de dioxina em equivalentes tóxicos (TEQ) de 2,3,7,8-TCDD (veja-se a nota 1 do anexo I).

As concentrações de cada substância numa determinada amostra são multiplicadas pelo respectivo TEF e, subsequentemente, somadas para darem a concentração total de compostos sob a forma de dioxina expressa em TEQ.

O conceito de «limites máximos» exige a utilização do limite de quantificação para o contributo de cada congénere não quantificado para o TEQ.

O conceito de «limites mínimos» exige a utilização de zero para o contributo de cada congénere não quantificado para o TEQ.

O conceito de «limites médios» exige a utilização de metade do limite de quantificação calculando o contributo de cada congénere não quantificado para o TEQ.

3. **Requisitos de garantia da qualidade a cumprir na preparação da amostra**

— Devem ser tomadas medidas para evitar a contaminação cruzada em cada etapa do procedimento de amostragem e de análise.

— As amostras devem ser conservadas e transportadas em contentores de vidro, alumínio, polipropileno ou polietileno. Devem ser removidos do recipiente da amostra os vestígios de poeiras de papel. O material de vidro deve ser enxaguado com solventes previamente submetidos a um controlo destinado a detectar a presença de dioxinas.

— O armazenamento e o transporte das amostras tem de ser realizado de modo a manter a integridade da amostra de alimentos.

— Desde que relevante, triturar finamente e misturar completamente cada amostra de laboratório, mediante um processo relativamente ao qual se tenha demonstrado que permite uma homogeneização completa (por exemplo, trituração que permita passar por um crivo de 1 mm); as

▼B

amostras devem ser exsicadas antes da trituração, caso o teor em humidade seja demasiado elevado.

— Efectuar uma análise em branco através da realização de todo o procedimento analítico, omitindo apenas a amostra.

— O peso da amostra utilizado para extracção deve ser suficiente para respeitar os requisitos no tocante à sensibilidade.

— Existem muitos procedimentos específicos para preparação de amostras que são satisfatórios e podem ser utilizados para os produtos em causa. Os procedimentos têm de ser validados de acordo com orientações aceites internacionalmente.

4. **Requisitos destinados aos laboratórios**

— Os laboratórios deverão demonstrar o desempenho de um método na gama do nível requerido, por exemplo, 0,5 vezes, 1 vez e 2 vezes da gama do nível requerido com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas. No que se refere aos critérios de aceitação, ver o ponto 5.

— O limite de quantificação de um método de confirmação deve situar-se na gama de cerca de um quinto do nível requerido, para garantir que são respeitados coeficientes de variações aceitáveis na gama do nível requerido.

— Os controlos regulares com ensaios em branco, com amostras enriquecidas ou análises de amostras de controlo (de preferência, se disponível, material de referência certificado) devem ser realizados como medidas internas de controlo de qualidade.

— O êxito da participação em estudos interlaboratoriais que avaliam a competência do laboratório é a melhor forma de provar competência em análises específicas. No entanto, o êxito da participação em estudos interlaboratoriais relativos, por exemplo, a amostras de solo ou de águas residuais não prova necessariamente que se seja competente no domínio das amostras de alimentos para o ser humano ou de alimentos para animais, visto se tratar de amostras que apresentam níveis de contaminação mais baixos. Consequentemente, é obrigatória a participação constante em estudos interlaboratoriais respeitantes à determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina nas matrizes relevantes de alimentos para animais/alimentos para o ser humano.

— Em conformidade com o disposto na Directiva 93/99/CEE, os laboratórios devem ser acreditados por um organismo reconhecido que opere em conformidade com o Guia ISO 58, a fim de assegurar que aplicam a garantia de qualidade analítica. Os laboratórios devem ser acreditados através da Norma ISO/IEC/17025:1999.

5. **Requisitos a cumprir pelo procedimento analítico para determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina**

Requisitos básicos de aceitação dos procedimentos analíticos:

— *Sensibilidade elevada e limites de detecção baixos*. Para os PCDD e PCDF, as quantidades detectáveis devem ser da ordem dos picogramas TEQ (10^{-12} g) devido à extrema toxicidade de alguns destes compostos. Sabe-se que os PCB ocorrem a níveis mais elevados do que os PCDD e PCDF. Para bastantes congéneres de PCB, a sensibilidade na gama dos nanogramas (10^{-9} g) já é suficiente. No entanto, para a medição dos congéneres de PCB sob a forma de dioxina mais tóxicos (designadamente, congéneres não-orto substituídos), deve ser conseguida a mesma sensibilidade que para os PCDD e PCDF.

— *Selectividade elevada (especificidade)*. É necessário estabelecer uma distinção entre PCDD, PCDF e PCB sob a forma de dioxina de inúmeros compostos co-extraídos e eventualmente interferentes, que estão presentes em concentrações que podem atingir várias ordens de grandeza superiores às substâncias a analisar. Relativamente aos métodos de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG-EM), é necessária uma diferenciação entre vários congéneres, tal como entre isómeros tóxicos (por exemplo os 17 PCDD e PCDF substituídos nas posições 2,3,7 e 8 e os PCB sob a forma de dioxina) e outros congéneres. Os bioensaios deviam ser capazes de determinar valores TEQ de forma selectiva como a soma de PCDD, PCDF e PCB sob a forma de dioxina.

— *Exactidão elevada (veracidade e precisão)*. A determinação devia fornecer uma estimativa válida da verdadeira concentração numa amostra. É necessária uma exactidão elevada (exactidão da medição: a aproximação do acordo entre o resultado de uma medição e o valor verídico ou atribuído da medição) por forma a evitar a rejeição do resultado da análise de uma amostra com base na reduzida fiabilidade da estimativa de TEQ. A exactidão é expressa como rigor (diferença

▼B

entre o valor médio medido para uma substância num material certificado e o respectivo valor certificado, expresso em percentagem deste valor) e precisão (a precisão é normalmente calculada como um desvio-padrão, incluindo a repetibilidade e a reprodutibilidade, e indica a aproximação do acordo entre os resultados obtidos através da aplicação do procedimento experimental várias vezes sob condições prescritas).

Os métodos de pré-selecção podem comprometer os bioensaios e os métodos CG-EM; os métodos de confirmação são métodos de cromatografia gasosa de elevada resolução/de espectrometria de massa de elevada resolução (CGER/EMER). Têm de ser cumpridos os seguintes critérios no valor TEQ total:

	Métodos de pré-selecção	Métodos de confirmação
Taxa de falsos negativos	< 1 %	
Rigor		– 20 % a + 20 %
CV	< 30 %	< 15 %

6. **Requisitos específicos dos métodos CG/EM a cumprir para fins de pré-selecção ou de confirmação**

— Deve ser efectuada logo no início do método analítico, por exemplo antes da extracção, a adição de padrões internos de PCDD/F marcados com ^{13}C e substituídos com cloro nas posições 2,3,7 e 8 (e de padrão interno de PCB sob a forma de dioxina marcado com 13C, caso seja necessário determinar PCB sob a forma de dioxina), por forma a validar o procedimento analítico. Deverá ser adicionado, pelo menos, um congénere para cada grupo homólogo de PCDD/F tetra a octo-clorados (e, pelo menos, um congénere para cada grupo homólogo de PCB sob a forma de dioxina, caso seja necessário determinar PCB sob a forma de dioxina), (alternativamente, deverá ser utilizado para o controlo de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina, pelo menos, um congénere para cada função de registo de iões seleccionados pela espectrometria de massa). Verifica-se uma nítida preferência, no caso dos métodos de confirmação, para a utilização dos padrões internos dos 17 PCDD/F substituídos nas posições 2,3,7 e 8 e marcados com ^{13}C e para o padrão interno de PCB sob a forma de dioxina marcado com ^{13}C (caso seja necessário determinar PCB sob a forma de dioxina).

Também devem ser determinados factores de resposta relativos para os congéneres aos quais não se adiciona um composto análogo marcado com ^{13}C, através da utilização de soluções de calibração adequadas.

— Em relação aos géneros alimentícios de origem vegetal e aos géneros alimentícios de origem animal que contenham menos de 10 % de gorduras, a adição de padrões internos é obrigatória antes da extracção. Em relação aos géneros alimentícios de origem animal que contenham mais de 10 % de gorduras, os padrões internos podem ser adicionados antes ou após a extracção de gorduras. Deve ser efectuada uma validação adequada da eficácia da extracção, dependendo da fase em que são introduzidos os padrões internos e de os resultados serem notificados com base no produto ou na gordura.

— Antes da análise por CG/EM, deverão ser adicionados 1 ou 2 padrões de recuperação (substituto).

— É necessário um controlo de recuperação. Para os métodos de confirmação, as recuperações de cada padrão interno deverão situar-se na gama de 60 a 120 %. Seriam aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais, nomeadamente para algumas dibenzodioxinas e dibenzofuranos hepta- e octo-clorados, desde que a sua contribuição para o valor TEQ não excedesse 10 % do valor total de TEQ (com base apenas em PCDD/F). Para os métodos de pré-selecção, as recuperações deverão situar-se na gama de 30 a 140 %.

— Devia proceder-se à separação entre dioxinas e compostos clorados interferentes, tais como PCB e éteres difenílicos clorados através de técnicas de cromatografia adequadas (de preferência com uma coluna de florisil, alumina e/ou carbono).

— Devia ser suficiente a separação de isómeros por cromatografia gasosa (< 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

— A determinação devia ser realizada de acordo com o método EPA 1613 revisão B: dioxinas e furanos tetra- a octo-clorados por diluição de

▼B

isótopos com CGER/EMER ou outro método com critérios de desempenho equivalentes.

— A diferença entre o nível superior e o nível inferior não deve exceder 20 % no caso de géneros alimentícios com uma contaminação por dioxinas de cerca de 1 pg TEQ-OMS/g de gordura (com base apenas em PCDD/PCDF). Relativamente a géneros alimentícios com baixo teor em gordura, terão de aplicar-se os mesmos requisitos respeitantes a níveis de contaminação de cerca de 1 pg TEQ-OMS/g de produto. Para níveis inferiores de contaminação, por exemplo, 0,50 pg TEQ--OMS/g de produto, a diferença entre o limite superior e o limite inferior poderá situar-se na gama de 25 % a 40 %.

7. **Métodos de análise de pré-selecção**

7.1. *Introdução*

No método de pré-selecção podem utilizar-se diferentes abordagens analíticas: uma abordagem puramente de pré-selecção e uma abordagem quantitativa.

Abordagem de pré-selecção

A resposta das amostras é comparada com a de uma amostra de referência no nível requerido. As amostras com uma resposta inferior à da referência são declaradas negativas, as amostras com uma resposta superior são positivas suspeitas. Requisitos:

— em cada série de testes terão de se incluir uma amostra em branco e uma de referência, que são extraídas e testadas ao mesmo tempo e em condições idênticas. A amostra de referência deve apresentar uma resposta claramente elevada em comparação com a amostra em branco;

— deviam incluir-se outras amostras de referência 0,5 vezes e 2 vezes do nível requerido para demonstrar o desempenho correcto do teste na gama requerida para o controlo do nível requerido;

— quando se testam outras matrizes, tem de se demonstrar a adequação das amostras de referência, preferencialmente incluindo amostras cuja CGER/EMER revelou conterem um nível TEQ próximo do da amostra de referência ou de uma amostra em branco enriquecida a este nível,

— uma vez que não se podem utilizar padrões internos nos bioensaios, são muito importantes os testes de repetibilidade para se obter informações sobre o desvio-padrão numa série de testes. O coeficiente de variação deve ser inferior a 30 %;

— para os bioensaios deverão ser definidos os compostos-alvo, as possíveis interferências e os níveis em branco máximos toleráveis.

Abordagem quantitativa

A abordagem quantitativa exige várias séries de diluições do padrão, purificação e medições em duplicado ou triplicado, bem como controlos em branco e de recuperação. O resultado poderá ser expresso em TEQ, partindo-se assim do princípio de que os compostos responsáveis pelo sinal correspondiam ao princípio de TEQ. Para o obter, pode usar-se TCDD (ou uma mistura-padrão de dioxina/furano) para produzir uma curva de calibração a fim de calcular o nível de TEQ no extracto e, consequentemente, na amostra. Posteriormente, este resultado é corrigido com o nível de TEQ calculado para uma amostra em branco (para levar em conta impurezas provenientes de solventes e produtos químicos utilizados) e para uma recuperação (calculada a partir do nível de TEQ numa amostra de controlo de qualidade próximo do nível requerido). É essencial referir que parte da perda de recuperação aparente pode dever-se a efeitos de matriz e/ou a diferenças entre os valores de TEF nos bioensaios e os valores oficiais de TEF fixados pela OMS.

7.2. *Requisitos destinados a métodos de análise utilizados para a pré-selecção*

— Na pré-selecção, poderão usar-se os métodos de análise e de bioensaio CG/EM. Para os métodos CG/EM deverão ser utilizados os requisitos descritos no ponto 6. Relativamente aos bioensaios com células, os requisitos específicos estão fixados no ponto 7.3 e, relativamente aos bioensaios com kits, no ponto 7.4.

— É necessária informação sobre o número de falsos positivos e falsos negativos de um conjunto grande de amostras abaixo e acima do nível máximo ou do nível de acção, em comparação com o teor de TEQ conforme determinado por um método de análise de confirmação. As taxas efectivas de falsos negativos deverão ser inferiores a 1 %. A taxa de amostras com falsos positivos deve ser suficientemente baixa para se poder recorrer vantajosamente ao instrumento de pré-selecção.

▼B

— Os resultados positivos têm sempre de ser confirmados por um método de análise de confirmação (CGER/EMER). Além disso, deviam confirmar-se por CGER/EMER as amostras de uma ampla gama de TEQ (aproximadamente 2 % a 10 % das amostras negativas). Deverá ser disponibilizada informação sobre a correspondência entre os resultados do bioensaio e os de CGER/EMER.

7.3. *Requisitos específicos destinados a bioensaios com células*

— Quando se procede a um bioensaio, cada teste exige uma série de concentrações de referência de TCDD ou uma mistura de dioxina/ /furano (curva de dose-resposta completa com um $R^2 > 0,95$). No entanto, para efeitos de pré-selecção, pode usar-se uma curva expandida de baixo nível para analisar as amostras de baixo nível.

— Devia usar-se uma concentração de referência de TCDD (cerca de 3 vezes o limite de quantificação) relativa a uma ficha de controlo de qualidade para o resultado do bioensaio durante um período de tempo constante. Como alternativa, podia utilizar-se a resposta relativa de uma amostra de referência por comparação com a recta de calibração de TCDD, uma vez que a resposta das células pode depender de muitos factores.

— Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo de qualidade (CQ) para cada tipo de material de referência, a fim de garantir que o resultado está conforme com as directrizes definidas.

— Em especial para os cálculos quantitativos, a indução da diluição da amostra utilizada deve encontrar-se dentro da porção linear da curva de resposta. As amostras que se encontrem acima da porção linear da curva de resposta devem ser diluídas e testadas de novo. Assim, recomenda-se a realização simultânea de testes com, pelo menos, tres ou mais diluições.

— O desvio-padrão percentual não deve ser superior a 15 % numa determinação em triplicado para cada diluição da amostra e não superior a 30 % entre três experiências independentes.

— O limite de detecção pode ser fixado como 3 vezes o desvio-padrão da solução em branco de solvente ou da resposta de base. Outra abordagem consiste em aplicar uma resposta que seja superior à base (factor de indução 5 vezes superior ao da solução em branco de solvente) calculada a partir da curva de calibração do dia. O limite de quantificação pode ser fixado como 5 a 6 vezes o desvio-padrão da solução em branco de solvente ou da resposta de base ou aplicar uma resposta que seja superior à base (factor de indução 10 vezes superior ao da solução em branco de solvente) calculada a partir da curva de calibração do dia.

7.4. *Requisitos específicos destinados a bioensaios com* kits [1]

— Devem ser respeitadas as instruções do fabricante no que se refere à preparação da amostra e às análises.

— Não devem ser utilizados os *kits* depois do prazo de validade.

— Não devem ser utilizados materiais ou componentes concebidos para serem usados com outros *kits*.

— Os *kits* devem ser mantidos dentro dos limites especificados para a temperatura de armazenamento e utilizados à temperatura de funcionamento especificada.

— O limite de detecção para os imunoensaios é determinado como 3 vezes o desvio-padrão, com base em 10 repetições da análise em branco, a ser dividido pelo valor da curva da equação de regressão linear.

— Devem ser utilizados padrões de referência para testes no laboratório a fim de se garantir que a capacidade de resposta ao padrão se encontra numa gama aceitável.

8. **Notificação do resultado**

Na medida em que o procedimento analítico utilizado o permita, os resultados analíticos devem conter os níveis de PCDD/F individual e de congéneres PCB e serem indicados como limites mínimos, limites máximos e limites médios, a fim de incluir o máximo de informações possível na notificação dos resultados e, deste modo, permitir a interpretação dos resultados de acordo com requisitos específicos.

[1] Não foram ainda apresentadas quaisquer provas de *kits* comercialmente disponíveis com base em bioensaios suficientemente sensíveis e fidedignos para serem utilizados na pré-selecção da presença de dioxinas aos níveis exigidos em amostras de géneros alimentícios e de alimentos para animais.

▼B

O relatório deverá também incluir o teor de lípidos da amostra bem como o método utilizado para a respectiva extracção.

As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas no caso de as recuperações estarem fora da gama mencionada no ponto 6, no caso de o limite máximo ser excedido e noutros casos mediante pedido.