II

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

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 14 de Julho de 1987

que estabelece os métodos a utilizar para a pesquisa de resíduos de substâncias com efeito tireostático

(87/410/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 85/358/CEE do Conselho, de 16 de Julho de 1985, que completa a Directiva 81/602/CEE respeitante à proibição de determinadas substâncias com efeito hormonal e de substâncias com efeito tireostático (1), alterado pelo Regulamento (CEE) nº 3768/85 (2), e, nomeadamente, o seu artigo 5º,

Considerando que, por força do nº 2 do artigo 5º da Directiva 85/358/CEE, compete à Comissão fixar, de acordo com o processo previsto no artigo 11º da supracitada directiva, os métodos de análise das amostras a utilizar para a presquisa de resíduos de substâncias com efeito hormonal e de substâncias com efeito tireostático;

Considerando que, nos termos do nº 1, alínea b), do artigo 4º da Directiva 64/433/CEE do Conselho, de 26 de Junho de 1964, relativa a problemas sanitários em matéria de comércio intracomunitário de carne fresca (3), com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 86/587/CEE (4), e do nº 4, segundo parágrafo, do artigo 11º da Directiva 85/397/CEE do Conselho, de 5 de Agosto de 1985, relativa aos problemas sanitários e de polícia sanitária no comércio intracomunitário de leite tratado termicamente (5), alterada pelo Regulamento (CEE) nº 3768/85, os exames dos resíduos devem ser efectuados segundo métodos cientificamente reconhecidos e comprovados na prática, nomeadamente os definidos em directivas comunitárias ou noutras normas internacionais;

Considerando que a determinação de métodos de análise das amostras inclui a definição dos processos de análise a utilizar, das regras a seguir para a amostragem e dos critérios relativos à realização das análises;

Considerando que os processos de análise a utilizar devem ser suficientemente sensíveis para detectar a presença de resíduos de substâncias com efeito hormonal e de substâncias com efeito tireostático;

Considerando que a amostragem constitui uma parte essencial do método de análise; que é, portanto, conveniente adoptar regras relativas à colheita das amostras;

Considerando que, em 20 de Dezembro de 1985, o Conselho adoptou a Directiva 85/591/CEE relativa à introdução de um modo de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo dos produtos alimentares destinados à alimentação humana (6); que para efeitos da presente decisão, é conveniente ter em conta os critérios previstos no ponto 1 do anexo da supracitada directiva;

Considerando que as medidas estatuídas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Veterinário Permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1º

Os processos de análise autorizados para a pesquisa de resíduos de substâncias com efeito hormonal e de substâncias com efeito tireostático são os seguintes:

(1) JO nº L 191 de 23. 7. 1985, p. 46.
(2) JO nº L 362 de 31. 12. 1985, p. 8.
(3) JO nº 121 de 29. 7. 1964, p. 2012/64.
(4) JO nº L 339 de 2. 12. 1986, p. 26.
(5) JO nº L 226 de 24. 8. 1985, p. 13.
(6) JO nº L 372 de 31. 12. 1985, p. 50.

— dosagem imunológica (DI),
— cromatografia em camada fina (CCF),
— cromatografia líquida de alta resolução (CLAR),
— cromatografia em fase gasosa (CFG),
— espectrometria de massa (EM),
— espectrometria (ES).

Artigo 2.º

A colheita de amostras deve efectuar-se de acordo com as seguintes regras:

1. A dimensão das amostras deve ser suficiente para permitir uma análise adequada, a sua repetição e a realização de ensaios de confirmação.

2. As amostras devem ser marcadas de modo a possibilitar a sua identificação em todos os estádios do exame.

3. Os métodos de acondicionamento, de conservação e de transporte da amostra devem manter a sua integridade e não prejudicar os resultados do exame.

Artigo 3.º

Os critérios relativos à realização das análises são fixados no anexo.

Artigo 4.º

A presente decisão será reexaminada antes de 1 de Janeiro de 1991 para se ter em conta a evolução dos conhecimentos científicos e técnicos.

Artigo 5.º

Os Estados-membros são destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 14 de Julho de 1987.

Pela Comissão
Frans ANDRIESSEN
Vice-Presidente

ANEXO

CAPÍTULO I: CRITÉRIOS GERAIS

Introdução

Para a avaliação objectiva dos métodos de detecção de resíduos, deve dispor-se de dados quantitativos sobre determinadas características-tipo desses processos. Além disso, devem ser estabelecidas exigências quantitativas para algumas destas características que tenham em conta, *inter alia*, o objectivo do método (ex. selecção, determinação quantitativa, confirmação). Neste capítulo, os cirtérios estabelecidos no anexo da Directiva 85/591/CEE são definidos tal como devem ser aplicados ao exame dos métodos de rotina destinados à análise de resíduos de substâncias com efeito hormonal e de substâncias com efeito tireostático.

Definições

i) *Especificidade*

A especificidade é a capacidade de um método de distinguir a substância a analisar de outras substâncias. Esta característica é, essencialmente, função do princípio de medição utilizado. As informações ligadas à especificidade devem estar relacionadas com, pelo menos, duas quaisquer substâncias susceptíveis de dar origem a um sinal quando for usado o princípio de medição descrito, por exemplo homólogas, análogas ou produtos metabólicos do resíduo em causa. A partir das informações relativas à especificidade, deve ser possível determinar quantitativamente até que ponto o método pode fazer a distinção entre a substância a analisar e outras substâncias, em condições experimentais.

ii) *Exactidão*

Neste documento, a exactidão é entendida como a exactidão da média. A definição a usar é estabelecida na norma ISO 3534-1977, no ponto 2.83 (exactidão da média : o grau de concordância entre o valor real e o valor médio, obtido através da aplicação do método experimental um número elevado de vezes).

Nota : As principais limitações relativas à exactidão são :

a) Os erros acidentais ;

b) Os erros sistemáticos.

Para um número muito elevado de experiências, a exactidão da média aproxima-se do erro sistemático.

Para análise documental de um método, o número de experiências deve ser especificado.

A medida da exactidão a utilizar é a diferença entre o valor médio medido para o material de referência e o valor real, expressa em percentagem do valor real.

iii) *Precisão :* repetibilidade no mesmo labroatório e reprodutibilidade das variabilidades no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes.

O termo de estatística geral « precisão » deve ser usado segundo a definição da norma ISO 3534-1977 no ponto 2.84 (precisão : grau de concordância entre os resultados obtidos através da aplicação repetida de um método experimental nas condições prescritas).

De acordo com o anexo da Directiva 85/591/CEE, os valores da precisão dos métodos de análise cuja adopção deve ser encarada, nos termos do disposto na referida directiva, devem ser obtidos através de um ensaio colectivo de preferência efectuado em conformidade com a norma ISO 5725-1986. Para esse fim, os termos repetibilidade e reprodutibilidade são definidos na norma ISO 5725-1986.

Para efectuar a pré-selecção dos métodos possíveis através de análise documental, basta que se encontrem disponíveis os dados relativos à repetibilidade. Para tal, o termo repetibilidade é, aqui, usado segundo a definição da norma ISO 3534-1977 no ponto 2.85 a) [repetibilidade : grau de correspondência entre resultados sucessivos obtidos com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, nas mesmas condições (mesmo operador, mesmos material e utensílios, mesmo laboratório e curtos intervalos de tempo)].

O valor da repetibilidade a usar é o coeficiente de variação definido no ponto 2.35 da norma ISO 3534-1977 (coeficiente de variação : a razão entre o desvio-padrão e o valor absoluto da média aritmética).

iv) *Limite de detecção*

O limite de detecção é o teor mínimo medido a partir do qual se pode deduzir a presença da substância a analisar com uma certeza estatística razoável. É igual à média do teor medido das amostras em branco representativas ($n \geqslant 20$) aumentada de três vezes o desvio-padrão da média.

Nota: Se se considera que factores tais como espécie, sexo, idade, etc. podem influenciar as características do método, para cada população homogénea a que o método deva ser aplicado, é necessário um conjunto de amostras em branco.

v) *Sensibilidade*

A sensibilidade é a medida da capacidade do método de fazer a distinção entre pequenas diferenças de teor da substância a analisar. Neste documento, a sensibilidade é definida como o declive da curva de calibração ao nível investigado.

vi) *Praticabilidade e aplicabilidade*

A praticabilidade é uma característica não pradronizada de um método analítico. Depende do objectivo do método e é determinada por exigências tais como a utilização de amostras e os custos.

A aplicabilidade diz respeito a uma lista dos produtos a que o método encarado pode ser aplicado tal com foi apresentado ou com pequenas alterações.

vii) *Podem ser seleccionados outros critérios, se necessário*

Limite de determinação

O limite de determinação é o mais baixo teor de substância a analisar, que, se a mesma estiver efectivamente presente, é detectado com uma certeza estatística razoável e que pode ser identificado de acordo com os critérios de identificação do método. Se a exactidão e a precisão forem constantes dentro de um intervalo de concentração situado em torno do limite de detecção, o limite de decisão é igual à média do teor medido das amostras em branco representativas majorada de seis vezes o desvio-padrão da média.

Limite de quantificação

O limite de quantificação é o mais baixo teor medido acima do qual é possível a determinação da substância a analisar com um grau específico de exactidão e de repetibilidade (no mesmo laboratório).

Exigências relativas à exactidão e à repetibilidade

Exactidão:

No caso de análises repetidas da amostra de referência, o desvio da média relativamente ao valor real, expresso em percentagem do valor real, deve situar-se dentro dos seguintes limites:

	limites
— valor real inferior ou igual a 1 µg/kg:	—50 % a +20 %
— valor real superior a 1 µg/kg: e inferior ou igual a 10 µg/kg:	—30 % a +10 %
— valor real superior a 10 µg/kg:	—20 % a +10 %

+10 *Repetibilidade*

No caso de análises repetidas da amostra de referência, o coeficiente de variação (c.v.) da média não deve exceder os seguintes valores:

	C.V.
— média inferior ou igual a 1 µg/kg:	0,30
— média superior a 1 µg/kg e inferior ou igual a 10 µg/kg:	µg/kg 0,20
— média superior a 10 µg/kg:	0,15

Curvas de calibração

Se o método depende das curvas de calibração, devem ser dadas as seguintes informações:

— modelo matemático que descreve a curva de calibração,

— valores numéricos dos parâmetros das curvas de calibração com intervalos de confiança de 95 % (em condições óptimas),

— intervalos aceitáveis no interior dos quais os parâmetros da curva de calibração podem variar de um dia para outro,

— zona útil da curva de calibração,

— dados relativos à variância das variáveis que se aplicam, pelo menos, na zona útil da curva de calibração.

Sensibilidade às perturbações

Relativamente a todas as condições experimentais que possam, na prática, estar sujeitas a variações (ex. estabilidade dos reagentes, composição da amostra, pH, temperatura), devem ser indicadas quaisquer variações susceptíveis de afectar os resultados analíticos.

Se se souber que determinadas substâncias podem perturbar a determinação da substância a analisar, tal facto deve, igualmente, ser indicado, bem como qualquer sugestão relativa ao modo de superar o problema. É de importância primordial que qualquer perturbação que possa surgir a partir dos componentes impuros seja investigada. Portanto, deve ser indicado, pelo menos, o equivalente da maior amostra que não perturbe a determinação da substância a analisar (após qualquer « limpeza » da amostra).

Relação entre as tolerâncias e os limites de determinação para análise

Relativamente às substâncias caracterizadas por uma tolerância nula, o limite de determinação do método analítico deve ser suficientemente baixo para que os níveis de resíduos geralmente esperados após o uso ilegal sejam detectados com, pelo menos 95 % de probabilidades.

Quanto às substâncias com um nível de tolerância fixado ao nível fisiológico natural máximo, o limite de quantificação não deve exceder essa tolerância, diminuída três vezes do desvio-padrão produzido pelo método para uma amostra ao nível de tolerância.

Material de referência

Um material de referência é uma amostra de uma substância ou um objecto fabricado individualmente do qual uma ou várias propriedades foram determinadas com uma suficiente exactidão, de modo a poder ser utilizado para calibrar um aparelho ou para verificar um método de medida. A confirmação deve ser baseada num processo tecnicamente válido.

Se nenhum material de referência estiver disponível, os parâmetros em exame podem ser determinados através da análise de uma amostra reforçada do material.

CAPÍTULO II : CRITÉRIOS QUALITATIVOS PARA A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. Lista de abreviaturas e símbolos

Termos gerais

CG	= cromatografia em fase gasosa ;
CLAP	= cromatografia em fase líquida sob alta pressão ;
CCFAR	= cromatografia em camada fina de alta resolução ;
EMAR	= espectrometria de massa de alta resolução ;
DI	= dosagem imunológica ;
IV	= infravermelhos ;
UV	= ultravioletas ;
EMBR	= espectrometria de massa de baixa resolução ;
EM	= espectrometria de massa ;
DRI	= dosagem radio-imunológica ;
ES	= espectrometria, exemplo : sistema de díodos ;
CCF	= cromatografia em camada fina ;
/	= técnicas associadas autónomas ;
—	= técnicas associadas em linha ;

Exemplo : CLAP/CG-EM-EM = CLAP autónoma seguida de CG com EM em linha.

Para DRI :

cpm	= contagens por minuto ;
dpm	= desintegrações por minuto ;
T	= radioactividade total (cpm ou dpm) adicionada à amostra ;
L	= radioactividade da fracção ligada de uma amostra ;
Lo	= radioactividade da fracção ligada da amostra em branco ;
L/Lo	= fracção da radioactividade da fracção ligada de uma amostra e em relação à da amostra em branco (« fracção de ligação em relação a uma ligação nula ») ;
% L/Lo	= radioactividade da fracção ligada de uma amostra expressa em percentagem da amostra em branco ;
Lo/T	= fracção da radioactividade da fracção ligada de uma amostra em branco em relação à actividade adicionada (« fracção da ligação nula em relação ao total ») ;
LNE	= ligação não específica = ligação específica (LAE) ;

Para EM :

uma	= unidade de massa atómica ;
IQ	= ionização química ;
IE	= ionização por impacto de electrões ;
DISM	= detecção de iões com sondas múltiplas ;
M	= massa ;
Z	= carga ;
HFB	= ácido heptafluorobutírico ou derivado do heptafluorobutirilo ;
MOX	= derivado da metoxina ;
TMS	= derivado do trimetilsililo ;
MOX-TMS	= derivado da metoxina e do trimetilsililo ;
F^+	= ião fragmentário ;
$(F+1)^+$	= satélite do isótopo natural, 1 M/Z superior ao ião fragmentário do isótopo principal correspondente ;
M^+	= ião molecular ;
$(M+1)^+$	= satélite do isótopo natural, 1 M/Z superior ao ião molecular do isótopo principal correspondente.

2. Introdução

Os critérios qualitativos para a interpretação dos resultados obtidos com métodos analíticos devem ser aplicados pelos laboratórios que efectuam testes para a detecção de resíduos de substâncias com acção hormonal e com acção tireostática, de acordo com as exigências do presente capítulo. Os critérios de qualidade são destinados à análise qualitativa e têm por objectivo evitar falsos resultados positivos. Para que uma conclusão seja positiva, os resultados analíticos têm de corresponder aos critérios qualitativos estabelecidos para o método de detecção utilizado.

3. **Definições relativas a presença de uma substância a analisar**

3.1. *Substância a analisar:* componente da amostra a testar cuja presença deve ser demonstrada. O termo « substância a analisar » inclui os derivados formados a partir da substância a analisar durante a análise, quando tal for o caso.

3.2. *Material padrão:* substância bem definida no seu grau máximo de pureza, destinada a ser usada na análise como substância de referência.

3.3. *Positivo:* a presença da substância a analisar na amostra é provada de acordo com o método, quando os critérios gerais e os critérios específicos do respectivo método de detecção em causa estiverem preenchidos. O resultado da análise é, então, « positivo ».

3.4. *Negativo:* o resultado da análise é considerado como « negativo » se os critérios especificados para o método em causa não estiverem preenchidos ou se a análise não indicar a presença da substância a analisar na amostra acima do limite de determinação.

3.5. *Co-cromatografia:* é aplicado o método seguinte. A solução purificada a testar, antes da execução da cromatografia, é dividida em duas partes:

a) Uma parte é submetida, em natureza, a cromatografia;

b) O material padrão a identificar é adicionado à outra parte e a mistura da substância a analisar e do material padrão é de seguida submetida a cromatografia.

A quantidade de material padrão adicionada deve ser aproximadamente igual à quantidade estimada da substância a analisar.

4. **Considerações gerais relativas ao método analítico**

4.1. *Critérios gerais aplicáveis ao método*

Deve ter sido provado que o método permite fazer a distinção entre a substância a analisar e todos os elementos perturbadores existentes na matriz a analisar.

O comportamento físico e químico da substância a analisar durante a análise não deve ser diferente do material padrão correspondente contido na matriz a analisar.

4.2. *Critérios gerais aplicáveis às técnicas de separação*

Durante todo o processo e simultaneamente com cada lote de amostras a analisar, devem ser analisadas amostras de referência, contendo quantidades conhecidas da substância a analisar. Em alternativa, pode juntar-se um padrão interno às amostras a analisar.

4.3. *Critério relativo a eventual pré-concentração, purificação e separação física e/ou química autónoma*

contido substância a analisar deve encontrar-se na fracção característica do material padrão correspondente cntido na matriz adequada.

4.4. *Critério aplicável a uma eventual separação em linha (exemplo: CG)*

A substância a analisar deve eluir durante o tempo de retenção característico do material padrão correspondente contido na matriz adequada.

4.5. *Preparação da amostra de ensaio*

A amostra de ensaio deve ser preparada a partir da amostra laboratorial, de modo a existir uma possibilidade máxima de detecção da substância a analisar, caso esta esteja presente.

4.6. *Preparação da fracção a testar*

A fracção a testar deve ser preparada a partir da amostra de ensaio, de modo a existir uma possibilidade máxima de detecção da substância a analisar, caso esta esteja presente.

5. **Exigências qualitativas relativas à determinação de uma substância a analisar por DRI**

Para a selecção:

5.1. Precisar a zona útil da curva de calibração que deve, geralmente, cobrir um intervalo de concentração de, pelo menos, dez unidades decimais.

5.2. Em cada ensaio, incluir amostras de controlo. Taxas de concentração: nula, fraca, média e superior da zona útil. Os resultados destes ensaios têm de estar em conformidade com os dos ensaios anteriores.

5.3. No limite de determinação, o coeficiente de variação para as amostras de controlo deve ser inferior a 0,15.

5.4. É necessário um mínimo de seis pontos de calibração, distribuídos adequadamente ao longo da curva de calibração.

5.5. A recuperação deve ser controlada e determinada.

5.6. A curva de calibrazão deve atingir a sua precisão máxima na proximidade do limite de determinação.

5.7. Os parâmetros adequados de controlo de qualidade devem estar em conformidade com os dos ensaios anteriores; exemplo: Lo/T, LNE, declive e ordenada da curva de calibração.

Nota: O respeito destes critérios de qualidade não exclui a possibilidade de obter falsos resultados positivos devidos as erros sistemáticos tais como reacções cruzadas dos anticorpos e/ou interferências de materiais não representativos na amostra.

6. **Critérios de identificação de uma substância a analisar pela detecção CG**

6.1. Eluir a substância a analisar durante o tempo de retenção característico do material padrão correspondente.

6.2. Separar o valor máximo do pico mais próximo do cromatograma por, pelo menos, um espaço total a meia altura máxima em relação ao pico considerado da substância a analisar.

6.3. Para identificação, é obrigatória uma co-cromatografia suplementar na fase CG. Em consequência, apenas o pico que se presume que corresponda à substância a analisar deve ser intensificado e a largura à meia altura máxima deve estar dentro de uma tolerância de ±10 % da largura original. Esta condição deve ser considerada como preenchida sempre que os tempos de retenção sejam idênticos no intervalo de 10 % da largura do pico à meia altura máxima.

7. **Critérios de identificação de uma substância a analisar por CCF ou CCFAR**

7.1. O(s) valor(es) R_f de uma substância a analisar deve(m) concordar cm o(s) valor(es) R_f característico(s) do material padrão. Esta condição é preenchida quando o(s) valor(es) R_f da substância a analisar se encontre(m) no limite de ±3 % do(s) valor(es) R_f do material padrão utilizado nas mesmas condições.

7.2. O aspecto visual da substância a analisar não deve poder ser distinguido do do material padrão.

7.3. O centro da mancha mais próxima da mancha devida à substância a analisar deve ser separado desta por, pelo menos, metade da soma dos diâmetros das manchas.

7.4. Para identificação, é necessário realizar uma co-cromatografia suplementar na fase CCF. Em consequência, apenas a mancha atribuída à substância a analisar deve ser intensificada ; não deve surgir uma nova mancha e o aspecto visual não deve mudar.

7.5. Para confirmação, é necessário uma CCF bi-dimensional.

8. **Critérios de identificação de uma substância a analisar pela detecção CLAP-ES**

8.1. O comprimento de onda de absorção máxima do espectro UV da substância a analisar deve ser igual ao do material padrão, dentro de uma margem determinada pela resolução do sistema de detecção. Para a detecção por um sistema de díodos, este valor situa-se tipicamente no intervalo ± 2 mm.

8.2. O espectro da substância a analisar não deve ser visualmente diferente do espectro do material padrão em relação aos elementos dos dois espectros caracterizados por uma absorvência relativa superior a 10 %. Este critério é preenchido quando os mesmos máximos estão presentes e quando em nenhum dos pontos observados a diferença entre os dois espectros é superior a 10 % da absorvência característica do material padrão.

8.3. Para identificação é necessário realizar uma co-cromatografia na fase CLAP. Em consequência, apenas o pico atribuído à substância a analisar deve ser intensificado.

9. **Critérios de identificação de uma substância a analisar por CCF-ES ou CCFAR-ES**

9.1. O(s) valor(es) R_f de uma substância a analisar deve(m) concordar com o(s) valor(es) R_f característico(s) do material padrão. Esta condição é preenchida quando o(s) valor(es) R_f da substância a analisar se encontre(m) no intervalo de ± 3 % do(s) valor(es) R_f do material padrão nas mesmas condições de utilização.

9.2. O aspecto visual da substância a analisar não deve poder ser distinguido do do material padrão.

9.3. O centro da mancha mais próxima da mancha devide à substância a analisar deve ser separado desta por, pelo menos, metade da soma dos diâmetros das manchas.

9.4. Para identificação, é necessário realizar uma co-cromatografia suplementar na fase CCF. Em consequência, apenas a mancha atribuída à substância a analisar deve ser intensificada ; não deve surgir uma nova mancha.

9.5. O comprimento de onda de absorção máxima no espectro da substância a analisar deve ser igual ao do material padrão, dentro de uma margem determinada pela resolução do sistema de detecção.

9.6. O espectro da substância a analisar não deve ser visualmente diferente do espectro do material padrão.

10. **Critérios de identificação de uma substância a analisar por CG-EMAR**

10.1. Para serem considerados como medidas de alta resolução, os resultados devem ser obtidos com uma resolução superior a 9 500 com um vale entre picos adjacentes não superior a 10 % das alturas dos picos.

10.2. A razão de intensidade da resposta dos iões F^+ e $(F+1)^+$ e M^+ e $(M+1)^+$ do derivado do material padrão deve ser igual ao valor teórico, dentro de uma margem de A %.

10.3. A massa fragmentária do derivado da substância a analisar (determinado por comparação dos picos) deve ser igual ao valor teórico do derivado correspondente do material de referência, dentro de uma margem de B uma.

Nota: Para diversos agentes anabólicos, os valores de A e de B são apresentados no Quadro 1 do apêndice como exemplos. Todavia, o método não se limita aos agentes anabólicos podendo a sua aplicação ser geral.

11. **Critérios de identificação de uma substância a analisar por CG-EMBR**

11.1. *Critérios relativos à cromatografia em fase gasosa*

11.1.1. O tempo de retenção de uma substância a analisar submetida a uma CG deve ser o mesmo que o dos padrões de referência, dentro de uma margem de ± 5 segundos.

11.1.2. Se for usado um padrão interno, o tempo de retenção relativo (B/A) da substância a analisar deve ser igual ao do material padrão, dentro de uma margem de ± 5/A na matriz adequada, sendo:

A = tempo de retenção absoluto do padrão interno, em segundos;

B = tempo de retenção absoluto da substância a analisar, em segundos.

11.2. *Critérios relativos à espectrometria de massa*

11.2.1. Todos os iões controlados devem ser derivados da substância a analisar eluída num tempo de retenção único.

11.2.2. Devem ser determinadas as intensidades de, pelo menos, dois iões ou, preferencialmente, de mais.

Nota: Para identificação inequívoca de uma substância a analisar, deve ser seleccionado um número adequado de iões, o qual depende do composto em causa e da especificidade dos iões escolhidos. Para a maioria dos derivados das substâncias anabólicas constantes dos Quadros 2 a 6 do apêndice, recomenda-se a selecção de, pelo menos, quatro iões.

11.2.3. As intensidades relativas dos iões detectados, expressas como uma percentagem da intensidade do ião de mais elevada intensidade (pico de base) devem ser as mesmas que as do padrão de referência adequado dentro de uma margem de ± 20 % (método IQ) ou ± 10 % (método II).

11.2.4. O ião molecular do material padrão deve, se possível, encontrar-se no espectro « DISM » da substância a analisar.

Nota: Nos Quadros 2 a 6 do apêndice, são apresentados como exemplos os iões moleculares e os iões fragmentários dos derivados TMS, MOX-TMS, MOX e HFB de um determinado número de agentes anabólicos e compostos conexos. Todavia, os critérios não se limitam a esses derivados podendo a sua aplicação ser geral.

12. **Critérios de identificação de uma substância a analisar por espectrometria IV**

12.1. *Definição de picos adequados*

Os picos adequados correspondem a máximos de absorção no espectro IV de um material padrão que satisfaça as seguintes exigências:

12.1.1. O máximo de absorcão encontra-se no intervalo de comprimentos de onda de 1 800 a 500 cm.

12.1.2. A intensidade da absorção não é inferior a:

12.1.2.1. um coeficiente de absorvência molar específica de:

— 40 relativamente à absorvência nula, e

— 20 relativamente à linha de base do pico,

ou

12.1.2.2. uma absorvência relativa de:

— 12,5 % da absorvência do pico mais intenso na zona de 1 800 a 500 cm^{-1} quando ambos são medidos relativamente à absorvência nula,

e

— 5 % da absorvência do pico mais intenso na zona de 1 800 a 500 cm^{-1} quando ambos são medidos relativamente à linha de base dos seus picos.

Nota: Apesar dos picos adequados referidos no ponto 12.1.2.1 poderem ser preferíveis numa perspectiva teórica, os referidos no ponto 12.1.2.2 são de mais fácil determinação prática.

12.2. *Número de picos adequados*

É necessário um mínimo de seis picos adequados.

12.3. *Codificação dos picos adequados*

As posições exactas dos picos adequados, em número de ondas inteiros, funcionam como parâmetros objectivos, numéricos, para a avaliação dos espectros das amostras.

Nota: No Quadro 7 do apêndice, são apresentados os picos adequados no espectro IV, de 49 agentes anabólicos e compostos conexos. Todavia, o método não se limita aos agentes anabólicos, podendo a sua aplicação ser geral.

12.4. *Uso dos quadros de picos adequados*

12.4.1. As posições dos picos no espectro IV da substância a analisar são comparadas com as posições dos picos adequados no espectro IV do material padrão.

12.4.2. Determinar o número de picos no espectro IV da substância a analisar cujas frequências correspondem a um pico adequado no espectro IV do material padrão, com uma margem de $\pm$ 1 cm^{-1}.

12.4.3. Calcular o « resultado » do material padrão no espectro da substância a analisar.

12.4.4. Definição do « resultado »

O « resultado » é a percentagem de picos adequados encontrada no espectro IV da substância a analisar.

12.5. *Critérios*

12.5.1. O resultado deve ser, pelo menos, 50 %.

12.5.2. O processo só é aplicável a picos de absorção do espectro da amostra com uma intensidade de, pelo menos, três vezes o ruído de pico a pico.

APÊNDICE

QUADRO 1

Dados para a confirmação dos agentes anabólicos por EMAR

Derivado (1)	Massa iónica		Razão de intensidade		Massa iónica	
	Ião F^+ ou Ião M^+, M/Z valor nominal (uma)	Ião $(F+1)^+$ ou Ião $(M+1)^+$, M/Z valor nominal (uma)	valor teórico	A margem (%)	M/Z valor teórico (2) (uma)	B M/Z margem (uma)
DES-TMS	M^+ 412	413	0,3777	8	412,2254	0,0012
DE-TMS	M^+ 410	411	0,3772	8,5	410,2097	0,0012
HEX-TMS	F^+ 207	208	0,1889	17	207,1205	0,0007
NT-TMS	M^+ 346	347	não aplicado		346,2328	0,0015
NT-TMS	F^+ 256	257	não aplicado		256,1827	0,0015
NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	não aplicado		375,2593	0,0015
epi NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	não aplicado		375,2593	0,0015
E2-di-TMS	M^+ 416	417	não aplicado		416,2567	0,0015

(1) DES = dietilestilbestrol,
DE = dienestrol,
HEX = hexestrol,
NT = 19-nortestosterona-17β (nandrolona),
epiNT = 19-nortestosterona-17α,
E2 = estradiol-17β.

(2) Calculado com base no isótopo ^{12}C = 12,0000.

QUADRO 2

Derivados TMS de vários agentes anabólicos e compostos conexos. Iões a utilizar para confirmação por EMBR (método IE)

	PM	M/Z (1)			
Dienestrol	410	410	395	381	
Dietilestilbestrol	412	412	397	383	
5α-Estrano-(3β,17α)-diol	422	407	332	242	201
17α-Estradiol	416	416	401	326	285
17β-Estradiol	416	416	401	326	285
17β-Estradiol-16,16,17(d3) (2)	419	419	404	329	285
Etinilestradiol	440	440	425	300	285
Hexestrol	414	207	191	179	
Metandrostenolona	372	372	357	302	282
Metiltestosterona	374	359	317	304	284
α-Nortestosterona	346	346	331	256	215
β-Nortestosterona	346	346	331	256	215
Testosterona	360	360	345	270	226
17-α-Trenbolona	342	342	252	237	211
17-β-Trenbolona	342	342	252	237	211
α-Zearalanol	538	538	523	433	307
β-Zearalanol	538	538	523	433	307
Zearalanona	464	464	449	335	307
Zearalenona	462	462	429	333	305

(1) Ião sublinhado: pico de base.
(2) Padrão interno.

QUADRO 3

Derivados MOX-TMS de vários agentes anabólicos e compostos conexos. Iões a utilizar para confirmação por EMBR (método IE)

	PM	M/Z (1)			
Medroxiprogesterona	474	474	459	443	353
Metandrostenolona	401	401	386	370	280
Metiltestosterona	403	403	313	298	282
α-Nortestosterona	375	375	360	344	285
β-Nortestosterona	375	375	360	344	285
Testosterona	389	389	374	358	268
α-Trenbolona	371	371	281	266	253
β-Trenbolona	371	371	281	266	253
Zearalanona	493	493	478	462	406
Zearalenona	491	491	460	444	333

(1) Ião sublinhado: pico de base.

QUADRO 4

Derivados MOX de vários agentes anabólicos e compostos conexos. Iões a utilizar para confirmação por EMBR (método IE)

	PM	M/Z (1)			
Acetato de medroxiprogesterona	415	415	330	312	287
Acetato de megestrol	413	413	353	338	310
Acetato de melengestrol	425	425	365	350	322
Acetato de trenbolona	341	341	298	281	266

(1) Ião sublinhado: pico de base.

QUADRO 5

Derivados HFB de vários agentes anabólicos e compostos conexos. Iões a utilizar para confirmação por EMBR (método IE)

	PM	M/Z (1)			
Dietilestilbestrol	660	660	631	447	341
Dienestrol	658	658	629	445	341
Hexestrol	662	332	331	304	303
17β-Estradiol,16,16,17(d3) (2)	667	667	454	412	359

(1) Ião sublinhado: pico de base.

(2) Padrão interno.

QUADRO 6

Derivados HFB de estilbenos.
Iões a serem usados para confirmação por EMBR (método IQ)

a) *Amónia IQ*

	PM	M/Z (1)			
Hexestrol	662	681	680	484	466
Dietilestilbestrol	660	678	482	464	

(1) Ião sublinhado: pico de base.

b) *Metano IQ*

	PM	M/Z (1)			
Dietilestilbestrol	660	661	465	464	
Dienestrol	658	659	463	462	369

(1) Ião sublinhado: pico de base.

Notas

1. As intensidades relativas de alguns dos iões acima indicados são demasiado baixas (cerca de 10 %) para srem usadas com segurança para efeitos de confirmação.
2. As intensidades relativas dos iões podem variar com a quantidade de substância a analisar injectada na coluna. No caso do dietilestilbestrol em baixas concentrações sob IQ em metano, o ião 661 torna-se o pico de base (i.e. produz-se menos fragmentação para a forma mono-HFB). Por conseguinte, é importante comparar as intensidades de iões relativas respeitantes à substância a analisar com as respeitantes ao padrão de referência, com concentração aproximadamente equivalente.
3. A ionização com metano dá origem a uma separação da molécula de hexestrol. Os iões fragmentários de menor massa, não se separam tão facilmente dos produtos co-extraídos.

QUADRO 7

Picos adequados nos espectros IV de 49 agentes anabólicos e compostos conexos

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
βE2	αE2	E2Ac	E2diAc	E2P	E2diP	E2S	E2Bz	E2ME	EE
		1 701	1 766 1 734	1 712	1 763 1 757 1 733		1 729		
1 610	1 610	1 620		1 696 1 619			1 600	1 610	1 615
1 586	1 586 1 500	1 584		1 583				1 577 1 502	1 584 1 501
1 498 1 449 1 416	1 443	1 498 1 460	1 494	1 499 1 460 1 444	1 492 1 460 1 419	1 494 1 420	1 498 1 451	1 469 1 444	1 473 1 449 1 433
1 382 1 357 1 320 1 302	1 379 1 352	1 373 1 351	1 375	1 350	1 381 1 351	1 392 1 307	1 380 1 315	1 374 1 334 1 313	1 384 1 358
1 283 1 250 1 231	1 284 1 253 1 234	1 292 1 276 1 248 1 235	1 262 1 248	1 288 1 249 1 225 1 212	1 273 1 247 1 224	1 241	1 266 1 223 1 216	1 291 1 278 1 252 1 236	1 299 1 257 1 203
1 156 1 130 1 118 1 102	1 154 1 119 1 101	1 152	1 198 1 177 1 149	1 151	1 197 1 154 1 139	1 176	1 176 1 152 1 128	1 183 1 153 1 130 1 120	1 184 1 160 1 147 1 135 1 122 1 111
1 056 1 021 1 012	1 074 1 054 1 036 1 013	1 017	1 040 1 015	1 086 1 072 1 012	1 078 1 055 1 033 1 014	1 097 1 075 1 049 1 018	1 067 1 025 1 012	1 055 1 042 1 025	1 069 1 055 1 043 1 022 1 006
962 930 917 905	994 970 945 919		946	962	917	932 908			971 930 914
874 820	866 821	873	885	878 871 816	897 807	887 866 847 822 808	889	898 870 818	880 857 823
786 733	787					770	705	785	789
		624				650	688		646 622
	573					579 519			568

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	E1	E3	Eq	Eqln	βT	αT	TAc	TP	TiC
	1 719		1 719	1 717			1 741	1 729	1 733
1 612	1 621	1 610	1 623	1 622	1 666 1 658 1 612	1 654 1 610	1 672 1 618	1 669 1 611	1 667 1 617
1 580 1 506	1 584	1 501	1 588 1 509 1 500	1 599					
1 467 1 449	1 499	1 452	1 470 1 407	1 480 1 460 1 423	1 470 1 432	1 432	1 449 1 433	1 450	1 470 1 450
1 377 1 352 1 325	1 396 1 361	1 384 1 353 1 322	1 354	1 389	1 378 1 360	1 380	1 377 1 362 1 333	1 331	1 378 1 331
1 291 1 255 1 242	1 287 1 250	1 285 1 254 1 238 1 201	1 278 1 246	1 225 1 208	1 277 1 233	1 276 1 231	1 274 1 232	1 270 1 240	1 294 1 272 1 230
1 183 1 165 1 146 1 133 1 121 1 109		1 174 1 149 1 118 1 103	1 158 1 148	1 169	1 199 1 131 1 114	1 189		1 185	1 182 1 125 1 103
1 062 1 036 1 019	1 055	1 068 1 062 1 034	1 056	1 066	1 067 1 056 1 017		1 041 1 022	1 080 1 043 1 020	1 043 1 009
967 905	920	964 943 928 917			957 943		945		941
862 844 833 823	877 819	886 871 851 818	875 810	849 817	870		863	863	864
789 702	788	787							
658 620	673	662							
		582							

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TD	TUn	TPP	TBz	MT	MT-D9 (11)	βNT	αNT	NTP	NTD
1 734	1 738	1 734	1 709					1 741	1 734
1 670 1 618	1 674 1 610	1 672 1 615	1 673 1 617	1 664 1 611	1 651 1 607	1 666 1 619	1 663 1 643 1 615	1 650 1 620	1 676 1 619
1 471 1 415	1 473	1 455 1 424	1 452 1 435	1 450		1 412		1 448 1 422	1 465 1 453
1 379 1 352 1 327	1 379 1 335 1 315	1 381	1 316	1 374	1 370 1 348 1 332	1 335		1 346	1 381 1 332
1 291 1 256 1 216	1 276 1 249 1 208	1 298 1 270 1 229	1 275 1 229	1 297 1 278 1 234	1 274 1 232	1 259 1 228 1 206	1 258 1 211	1 265 1 202	1 258 1 212
1 180	1 172	1 171	1 178 1 110	1 190 1 156	1 188 1 173 1 153 1 128 1 104	1 133	1 135		1 177
		1 068 1 009	1 070 1 023	1 091		1 075 1 052 1 023	1 051	1 085 1 052 1 025	
		944	998 941	950	956 937	967	968	968	
867	887	862	866	873	882	885	880	884	
		748 709	719						
		699	688		692				

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
NTL	NTPP	Eti	βTB	αTB	TBA	P	MP	MPA	MGA
1 735	1 730				1 737			1 732 1 717	1 731 1 710
1 676 1 619	1 675 1 618	1 659 1 612	1 639	1 643	1 660	1 699 1 663 1 616	1 696 1 664 1 603	1 673 1 608	1 664 1 629
	1 501		1 569	1 578	1 573				1 584
1 473 1 418	1 447	1 430 1 418	1 438	1 450 1 435	1 439	1 439	1 448		1 460 1 447
1 381 1 335	1 330	1 383 1 331	1 379 1 353 1 346 1 322	1 391 1 369 1 346 1 321 1 310	1 375	1 386 1 358 1 328	1 349	1 365	1 390 1 366
1 299 1 269 1 240 1 205	1 297 1 259 1 205	1 288 1 232	1 288 1 267 1 226	1 279 1 240 1 229	1 245	1 279 1 237 1 228 1 204	1 271 1 233	1 261 1 253	1 269 1 260 1 247 1 224
1 175	1 177	1 191 1 125	1 199 1 101	1 198 1 150 1 126		1 162	1 186 1 123	1 187	1 167 1 143 1 127 1 109
1 053	1 080 1 049	1 068 1 060	1 075 1 054 1 017	1 088 1 028 1 011	1 096 1 053 1 023		1 093	1 080 1 056	1 083 1 059 1 014
	965			937	987	948		965	963
	879	869		852		871	871		878
	752 704	724		795 762					
		697							
							597		

41	42	43	44	45	46	47	48	49
MLGA	DE	DES	HEX	DEdiAc	DESdiP	Z	Cort	HCort
1 738 1 716				1 757	1 763 1 754			1 714
1 666 1 625	1 619 1 608	1 609	1 613			1 644 1 615	1 694 1 648 1 618	1 644 1 610
1 579	1 591 1 513	1 590 1 514	1 598 1 516	1 503	1 504	1 587		
1 444 1 416	1 426	1 462 1 427	1 458 1 440		1 459	1 464	1 447 1 413	1 432
1 389 1 372 1 318	1 333	1 337		1 368	1 363	1 381 1 353 1 311	1 391	
1 260 1 245 1 231 1 205	1 247 1 205	1 282 1 247 1 204	1 218	1 218	1 210	1 259 1 200	1 269	1 271 1 237
1 123	1 171 1 102	1 173 1 114	1 174 1 107	1 196 1 164	1 157	1 167	1 186 1 159	1 133 1 115
1 037		1 012		1 019	1 076 1 019	1 096 1 075	1 075 1 064 1 037	1 047 1 006
972 953 930				910		989		942 900
881	853 834 826	851 831 805	847 830 804	865	895	840	875	865
	775	721	716					
627 612	649 620	646	646	679				
551	520	586	573 510					

Lista de abreviaturas

1. βE2	Estradiol-17β
2. αE2	Estradiol-17α
3. E2Ac	Acetato de estradiol-17
4. E2diAc	Diacetato de estradiol
5. E2P	Propionato de estradiol-17
6. E2diP	Dipropionato de estradiol
7. E2S	Sulfato de estradiol-3
8. E2Bz	Benzoato de estradiol-3
9. E2ME	Estradiol-3-metileter
10. EE	Etiilestradiol
11. M	Mestranol
12. E1	Estrona
13. E3	Estriol
14. Eq	Equilino
15. Eqln	Equilenino
16. βT	Testosterona-17β
17. αT	Testosterona-17α
18. TAc	Acetato de testosterona
19. TP	Propionato de testosterona
20. TiC	Isocaproato de testosterona
21. TD	Decanoato de testosterona
22. TUn	Undecanoato de testosterona
23. TPP	Fenilpropionato de testosterona
24. TBz	Benzoato de testosterona
25. MT	Metiltestosterona-17α
26. MT-DP(11)	Metiltestosterona-D9(11)
27. βNT	Nortestosterona-17β
28. αNT	Nortestosterona-17α
29. NTP	Propionato de nortestosterona
30. NTD	Decanoato de nortestosterona
31. NTL	Laurato de nortestosterona
32. NTPP	Fenilpropionato de nortestosterona
33. Eti	Etisterona
34. βTB	Trenbolona-17β
35. αTB	Trenbolona-17α
36. TBA	Acetato de trenbolona
37. P	Progesterona
38. MP	Medroxiprogesterona
39. MPA	Acetato de medroxiprogesterona
40. MG	Acetato de megestrol
41. MLGA	Acetato de melengestrol
42. DE	Dienestrol
43. DES	Dietilestilbestrol
44. HEX	Hexestrol
45. DEdiAc	Diacetato de dienestrol
46. DESDiP	Dipropionato de dietilestribestrol
47. Z	Zeranol
48. Cort	Corticosterona
49. HCort	Hidrocortisona