

Portaria n.º 467/98, de 30 de Julho**Métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos e de higiene corporal**

Por imperativos de transposição de regras comunitárias, as Portarias n.os 503/94, de 6 de Julho, e 1192/97, de 22 de Novembro, publicadas ao abrigo do Decreto-Lei n.º 128/86, de 3 de Junho, estabeleceram e definiram os métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos e de higiene corporal e das respectivas matérias-primas.

Entretanto foi publicada a Directiva n.º 96/45/CE, da Comissão, de 2 de Julho, que estabelece os métodos de análise para a identificação e doseamento de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo, e que deve, igualmente, ser transposta para o ordenamento jurídico interno.

Assim, nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 10.º do Decreto-Lei n.º 128/86, de 3 de Junho:

Manda o Governo, pelos Ministros da Economia e da Saúde, que sejam estabelecidos os métodos de análise para a identificação e doseamento de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo, constantes do anexo à presente portaria e que dela faz parte integrante.

Ministérios da Economia e da Saúde.

Assinada em 16 de Junho de 1998.

O Ministro da Economia, *Joaquim Augusto Nunes de Pina Moura*. - A Ministra da Saúde, *Maria de Belém Roseira Martins Coelho Henriques de Pina*.

ANEXO**Métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos e de higiene corporal**

(capítulo XXXVI da Directiva n.º 96/45/CE, da Comissão, de 2 de Julho)

Ensaaios

2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo - identificação e doseamento.

A - Identificação

1 - Objectivo e campo de aplicação. - O presente método descreve a técnica de cromatografia em camada fina que, combinado com o método de determinação descrito na parte B, permite identificar o 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo.

2 - Princípio. - Os conservantes são extraídos com acetona da amostra do cosmético acidificada. Após filtração, a solução de acetona é misturada com água e os ácidos gordos são precipitados num meio alcalino sob a forma de sais de cálcio. A

mistura alcalina acetona-água é extraída com éter dietílico para retirar as substâncias lipofílicas. Após acidificação, extraem-se os conservantes com éter dietílico.

Aplica-se uma fracção do extracto de éter dietílico sobre uma placa de camada fina revestida com sílica gele. Após a revelação da placa, observa-se, com luz ultravioleta, o cromatograma obtido, que é revelado com a ajuda de reagente de Millon.

3 - Reagentes:

3.1 - Generalidades. - Todos os reagentes utilizados devem ser analiticamente puros. Deve utilizar-se água destilada ou de pureza equivalente.

3.2 - Acetona.

3.3 - Éter dietílico.

3.4 - *n*-pentano.

3.5 - Metanol.

3.6 - Ácido acético, glacial.

3.7 - Solução de ácido clorídrico, $c(HCl) = 4 \text{ mol/l}$.

3.8 - Solução de hidróxido de potássio, $c(KOH) = 4 \text{ mol/l}$.

3.9 - Cloreto de cálcio bi-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$).

3.10 - Revelador: reagente de Millon.

O reagente de Millon [nitrito de mercúrio (II)] é uma solução pronta para utilização à venda no mercado (Fluka 69820).

3.11 - 2-fenoxietanol.

3.12 - 1-fenoxi-2-propanol.

3.13 - 4-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno).

3.14 - 4-hidroxibenzoato de etilo (etilparabeno).

3.15 - 4-hidroxibenzoato de *n*-propilo (propilparabeno).

3.16 - 4-hidroxibenzoato de *n*-butilo (butilparabeno).

3.17 - 4-hidroxibenzoato de benzilo (benzilparabeno).

3.18 - Soluções de referência.

Preparar soluções a 0,1% (m/v) de cada uma das substâncias de referência 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 e

3.17 em metanol.

3.19 - Solvente de revelação. - Misturar 88 volumes de *n*-pentano com 12 volumes de ácido acético glacial.

4 - Material e equipamento. - Material corrente de laboratório e:

4.1 - Banho de água, capaz de manter a temperatura a 60°C;

4.2 - Tina de cromatografia (não forrada com papel de filtro);

4.3 - Fonte de luz ultravioleta, 254 nm;

4.4 - Placas para cromatografia em camada fina, 20 cm x 20 cm, previamente revestidas com 0,25 mm de sílica gele 60 F₂₅₄, com zona de concentração (Merck n.º 11798, Darmstadt, ou equivalente);

4.5 - Estufa, capaz de manter temperaturas até 105°C;

4.6 - Secador de ar quente;

4.7 - Rolo de pintar, em lã, com aproximadamente 10 cm de comprimento e 3,5 cm de diâmetro externo. A espessura da camada de lã deverá ser de 2 mm-3 mm. Desbastar a lã, se necessário;

(V. nota do ponto 5.2.)

4.8 - Tubos de ensaio de 50 ml com tampa de rosca;

4.9 - Placa eléctrica de aquecimento, com termóstato. Regulação da temperatura: aproximadamente 80°C. A placa de aquecimento deve estar coberta com uma placa de alumínio de 20 cm x 20 cm e com uma espessura de, aproximadamente, 6 mm, a fim de proporcionar uma distribuição uniforme do calor.

5 - Técnica:

5.1 - Preparação das amostras. - Pesar cerca de 1 g de amostra para um tubo de ensaio de 50 ml com tampa de rosca. Adicionar quatro gotas de solução de ácido clorídrico (3.7) e 40 ml de acetona.

Para produtos cosméticos fortemente básicos, como sabonetes, devem adicionar-se 20 gotas de solução de ácido clorídrico. Fechar o tubo, aquecer lentamente a mistura até uma temperatura aproximada de 60°C, a fim de facilitar a extracção dos conservantes para a fase de acetona e agitar vigorosamente durante um minuto.

Medir o pH da solução com papel indicador de pH e ajustar o pH da solução a = 3 com solução de ácido clorídrico. Agitar de novo, vigorosamente, durante um minuto.

Deixar arrefecer a solução à temperatura ambiente e filtrar com papel de filtro para um Erlenmeyer. Transferir 20 ml deste filtrado para um Erlenmeyer de 200 ml, adicionar 60 ml de água e homogeneizar. Ajustar o pH da mistura a 10, aproximadamente, com solução de hidróxido de potássio (3.8), utilizando papel indicador de pH.

Acrescentar 1 g de cloreto de cálcio bi-hidratado (3.9) e agitar vigorosamente. Filtrar a solução através de um papel de filtro para uma ampola de decantação de 250 ml contendo 75 ml de éter dietílico e agitar vigorosamente durante um minuto. Deixar separar as fases e recolher a camada aquosa num Erlenmeyer de 200 ml. Ajustar o pH da solução a aproximadamente 2 com solução de ácido clorídrico, usando papel indicador de pH. Seguidamente, adicionar 10 ml de éter dietílico e agitar vigorosamente durante um minuto. Deixar separar as fases e transferir aproximadamente 2 ml da camada de éter dietílico para um tubo de amostragem de 5 ml.

5.2 - Cromatografia de camada fina (CCF). - Colocar uma placa de cromatografia em camada fina CCF (4.4) sobre uma placa de alumínio aquecida (4.9). Aplicar 10 ml de cada uma das soluções de referência (3.18) e 100 ml da ou das soluções da amostra (5.1) sobre uma linha de partida na zona de concentração da placa CCF.

Pode usar-se um fluxo de ar para facilitar a evaporação do solvente. Retirar a placa CCF da placa de aquecimento e deixar arrefecer à temperatura ambiente. Transferir 100 ml do solvente de desenvolvimento (3.19) para uma tina de cromatografia (4.2).

Colocar a placa CCF imediatamente na câmara não saturada e desenvolver à temperatura ambiente, até que a frente do solvente se encontre a 15 cm da linha de base. Retirar a placa da tina e secar numa corrente de ar quente, com o auxílio de um secador de ar quente.

Examinar a placa sob luz ultravioleta (4.3) e marcar a posição das manchas. Aquecer a placa durante trinta minutos numa estufa (4.5) a 100°C, para retirar o excesso de ácido acético. Visualizar os conservantes no cromatograma com reagente de Millon (3.10), mergulhando o rolo de pintar (4.7) no reagente, passando o rolo sobre a placa CCF até ela se encontrar uniformemente humidificada.

Nota. - As manchas também podem ser visualizadas com a aplicação cuidadosa de uma gota de reagente de Millon em cada uma das manchas marcadas com luz ultravioleta.

Os ésteres de ácido 4-hidroxibenzoico surgem sob a forma de manchas vermelhas e o 2-fenoxietanol e o 1-fenoxi-2-propanol como manchas amarelas. Todavia, é de registar que o próprio ácido 4-hidroxibenzoico, que pode estar presente nas amostras como conservante ou produto da decomposição dos parabenos, também surgirá sob a forma de mancha vermelha (v. pontos 7.3 e 7.4).

6 - Identificação. - Calcular o valor de R de cada mancha. Comparar os valores de R_f das manchas obtidas com a solução da amostra com os obtidos com as soluções de referência, o seu comportamento sob radiação ultravioleta e a cor após a revelação. Tirar conclusões preliminares quanto à identidade dos conservantes.

Caso se constate a presença de parabenos, deve seguir-se o procedimento HPLC (cromatografia líquida de alta resolução) descrito na parte B. Comparar os resultados obtidos por CCF e HPLC para confirmar a presença de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol e parabenos.

7 - Observações:

7.1 - Devido à toxicidade do reagente de Millon, a melhor maneira de o aplicar é através de um dos procedimentos descritos. A vaporização não é recomendada.

7.2 - Outros compostos contendo grupos hidroxilos podem também dar coloração com o reagente de Millon. Pode consultar-se o quadro das cores e dos valores de R_f obtidos para um certo número de conservantes através do procedimento CCF em N. de Kruijf, M. A. H. Rijk e L. A. Pranato-Soetardhi, A. Schouten (1987): Determination of preservatives in cosmetic products, «I - Thin layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products» (J. Chromatography 410, 395-411).

7.3 - Os valores de R_f apresentados no quadro seguinte servem de indicação aos valores que podem ser obtidos:

Composto	R_f	Cor
Ácido 4-hidroxibenzoico.....	11	Vermelha
Metilparabeno.....	12	Vermelha
Etilparabeno.....	17	Vermelha
Propilparabeno.....	21	Vermelha
Butilparabeno.....	26	Vermelha
Benzilparabeno.....	16	Vermelha
2-fenoxietanol.....	29	Amarela
1-fenoxi-2-propanol.....	50	Amarela

7.4 - Não se obtém qualquer separação com ácido 4-hidroxibenzoico e metilparabeno, nem com benzilparabeno e etilparabeno. A identificação destes compostos deve ser confirmada com o método HPLC descrito na parte B, comparando os tempos de retenção obtidos com a amostra com os tempos de retenção dos padrões.

B - Doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação. - Este método especifica um procedimento para a determinação de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo.

2 - Definição. - As quantidades de conservantes determinadas por este método são expressas em percentagem por massa.

3 - Princípio. - A amostra é acidificada com a adição de ácido sulfúrico e, em seguida, colocada em suspensão numa mistura de etanol e água. Aquecer lentamente a mistura, por forma a fundir a fase lipídica e promover a extracção quantitativa. Filtrar a mistura.

Os conservantes do filtrado são determinados por HPLC de fase inversa usando o 4-hidroxibenzoato de isopropilo como padrão interno.

4 - Reagentes:

4.1 - Todos os reagentes devem ser analiticamente puros e adequados para HPLC quando aplicável.

Deve utilizar-se água destilada ou de pureza equivalente.

4.2 - Etanol, absoluto.

4.3 - 2-fenoxietanol.

4.4 - 1-fenoxi-2-propanol.

4.5 - 4-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno).

4.6 - 4-hidroxibenzoato de etilo (etilparabeno).

4.7 - 4-hidroxibenzoato de n-propilo (propilparabeno).

4.8 - 4-hidroxibenzoato de isopropilo (isopropilparabeno).

4.9 - hidroxibenzoato de n-butilo (butilparabeno).

4.10 - 4-hidroxibenzoato de benzilo (benzilparabeno).

4.11 - Tetra-hidrofurano.

4.12 - Metanol.

4.13 - Acetonitrilo.

4.14 - Solução de ácido sulfúrico, $c(H_2SO_4) = 2 \text{ mol/l}$.

4.15 - Mistura de etanol-água.

Misturar nove volumes de etanol (4.2) e um volume de água.

4.16 - Padrão interno. - Pesar com precisão cerca de 0,25 g de isopropilparabeno (4.8), transferir para um balão volumétrico de 500 ml, dissolver e completar o volume com a mistura de etanol/água (4.15).

4.17 - Fase móvel: mistura de tetra-hidrofurano/água/metanol/acetonitrilo.

Misturar 5 volumes de tetra-hidrofurano, 60 volumes de água, 10 volumes de metanol e 25 volumes de acetonitrilo.

4.18 - Solução mãe de conservantes. - Pesar cuidadosamente cerca de 0,2 g de 2-fenoxietanol, 0,2 g de 1-fenoxi-2-propanol, 0,05 g de metilparabeno, 0,05 g de etilparabeno, 0,05 g de propilparabeno, 0,05 g de butilparabeno e 0,025 g de benzilparabeno para um balão volumétrico de 100 ml, dissolver e completar o volume com a mistura de etanol/água.

Mantida em frigorífico, a solução permanece estável durante uma semana.

4.19 - Soluções padrão de conservantes. - A partir da solução mãe (4.18), transferir respectivamente 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml e 1,00 ml para balões volumétricos de 50 ml. Adicionar a cada balão 10,00 ml do padrão interno (4.16) e 1 ml de solução de ácido sulfúrico (4.14) e completar o volume com a mistura de etanol/água.

Estas soluções devem ser de preparação recente.

5 - Material e equipamento. - Material corrente de laboratório e:

5.1 - Banho de água, capaz de manter uma temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;

5.2 - Cromatógrafo para cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detector UV, comprimento de onda de 280 nm.

5.3 - Coluna analítica:

Aço inoxidável, 25 cm x 4,6 mm Ø interno (ou 12,5 cm x 4,6 mm Ø interno) com Nucleosil 5C18, ou equivalente (v. ponto 10.1);

5.4 - Tubos de ensaio de 100 ml com tampa de rosca;

5.5 - Regularizadores de ebulição, carborundum, dimensão 2 mm-4 mm, ou equivalente.

6 - Técnica:

6.1 - Preparação da amostra:

6.1.1 - Preparação da amostra sem adição de padrão interno. - Pesar aproximadamente 1 g de amostra para um tubo de ensaio de 100 ml com tampa de rosca.

Pipetar para o tubo 1,0 ml de solução de ácido sulfúrico (4.14) e 50,0 ml de mistura de etanol-água (4.15). Adicionar aproximadamente 1 g de regularizadores de ebulição (5.5), fechar o tubo e agitar vigorosamente até obter uma suspensão homogénea.

Agitar durante, pelo menos, um minuto. Colocar o tubo, durante cinco minutos, num banho de água (5.1) mantido a uma temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e para facilitar a extracção dos conservantes para a fase de etanol.

Arrefecer imediatamente o tubo debaixo de um jacto de água fria e guardar o extracto no frigorífico durante uma hora. Filtrar o extracto com papel de filtro.

Transferir aproximadamente 2 ml do filtrado para um tubo de amostragem de 5 ml. Guardar os extractos no frigorífico e proceder à determinação, por HPLC, num prazo de vinte e quatro horas.

6.1.2 - Preparação da amostra com adição de padrão interno. - Pesar, com uma aproximação de três décimos, $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de amostra para um tubo de ensaio de 100 ml com tampa de rosca (a, massa em gramas da toma da amostra).

Introduzir no tubo, com a ajuda de uma pipeta, 1,0 ml de solução de ácido sulfúrico e 40,0 ml da mistura etanol-água. Adicionar aproximadamente 1 g de regularizadores de ebulição e precisamente 10,00 ml de padrão interno. Fechar o tubo e agitar vigorosamente até obter uma suspensão homogénea.

Agitar durante, pelo menos, um minuto. Colocar o tubo, durante cinco minutos, num banho de água mantido a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para facilitar a extracção dos conservantes para a fase de etanol.

Arrefecer imediatamente o tubo sob um jacto de água fria e guardar o extracto no frigorífico durante uma hora. Filtrar o extracto com papel de filtro.

Transferir aproximadamente 2 ml do filtrado para um tubo de amostragem de 5 ml (solução de ensaio). Guardar o extracto no frigorífico e proceder às determinações por HPLC num prazo de vinte e quatro horas.

6.2 - Cromatografia líquida de alta resolução:

6.2.1 - Condições cromatográficas:

Fase móvel: mistura de tetra-hidrofurano-água-metanol-acetonitrilo (4.17);

Débito: 1,5 ml/minuto;

Comprimento de onda: 280 nm.

6.2.2 - Calibração. - Injectar 10 µl de cada uma das soluções padrão de conservantes (4.19). A partir dos cromatogramas obtidos, determinar as relações entre as alturas dos picos das soluções padrão dos conservantes e a altura do pico do padrão interno. Desenhar uma curva para cada conservante, relacionando estas relações com as concentrações das soluções padrão.

6.2.3 - Doseamento. - Injectar 10 µl da solução da amostra sem padrão interno (6.1.1) no cromatógrafo e registar o cromatograma.

Injectar 10 µl de uma das soluções padrão dos conservantes (4.19) e registar o cromatograma.

Comparar os cromatogramas obtidos. Se, no cromatograma do extracto da amostra (6.1.1), não houver qualquer pico que tenha aproximadamente o mesmo tempo de retenção que o isopropilparabeno (padrão interno recomendado), injectar 10 µl de solução de amostra com padrão interno (6.1.2). Registar o cromatograma e medir as alturas dos picos.

Se se observar um pico de interferência no cromatograma da solução de amostra com aproximadamente o mesmo tempo de retenção que o isopropilparabeno, deve ser seleccionado outro padrão interno. Caso um dos conservantes considerados estiver ausente do cromatograma da amostra, este conservante pode ser usado como padrão interno alternativo.

Calcular as relações entre as alturas dos picos dos conservantes analisados e a altura do pico do padrão interno.

Verificar se se obteve uma resposta linear para as soluções padrão utilizadas no procedimento de calibração.

Verificar se os cromatogramas obtidos para uma solução padrão e para a solução da amostra satisfazem os seguintes requisitos:

A separação dos picos deve ser, no mínimo, de 0,90 entre qualquer par de picos. (Relativamente à definição de separação dos picos, v. a figura 1.)

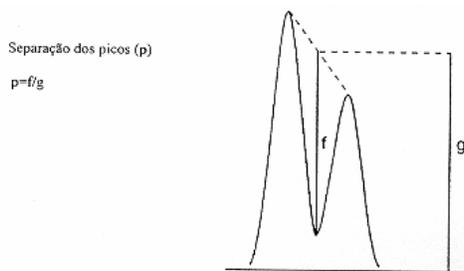


Figura 1 — Separação dos picos

Se não se obtiver a separação exigida, deve usar-se uma coluna mais eficiente ou ajustar-se a composição da fase móvel até se preencher o requisito;

O factor de assimetria A_s de todos os picos obtidos deve oscilar entre 0,9 e 1,5. (Relativamente à definição do factor de assimetria dos picos, v. a figura 2.) Para registar o cromatograma para a determinação do factor de assimetria, recomenda-se uma velocidade de desenrolamento do papel de, pelo menos, 2 cm/minuto.

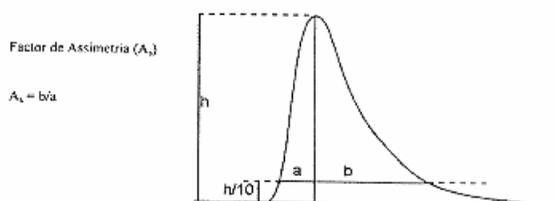


Figura 2 — Factor de assimetria dos picos

Obter-se-á uma linha de base estável.

7 - Cálculos. - Utilizar uma curva de calibração (6.2.2) e as relações entre as alturas dos picos dos conservantes analisados e a altura dos picos do padrão interno para calcular a concentração dos conservantes na solução da amostra.

Calcular os teores de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo, W_i como percentagem em peso (% m/m), usando a fórmula:

$$\% W_i \text{ (m/m)} = \frac{b_i}{200 \times a}$$

em que:

b_i = a concentração ($\mu\text{g/ml}$) de conservante i na solução de ensaio lida na curva de calibração; e

a = a massa (g) da toma amostra.

8 - Repetibilidade (¹). - V. as observações do ponto 10.5.

9 - Reprodutibilidade (¹). - V. as observações do ponto 10.5.

10 - Observações:

10.1 - Fase estacionária. - O comportamento de retenção dos solutos nas determinações por HPLC depende grandemente do tipo, marca e história da fase estacionária. Os resultados obtidos com as soluções padrão permitem concluir se se pode, ou não, utilizar uma coluna para a separação dos conservantes considerados (v. as observações em 6.2.3). Para além do material de enchimento da coluna proposto, foram ainda considerados adequados o Hypersil ODS e o Zorbax ODS.

Em alternativa, pode otimizar-se a composição da fase móvel recomendada para se obter a separação exigida.

10.2 - Comprimento de onda de detecção. - Um ensaio de robustez realizado ao método descrito demonstrou que uma ligeira alteração no comprimento de onda de detecção pode ter consequências significativas para os resultados da determinação.

Por este motivo, este parâmetro deve ser cuidadosamente controlado durante a análise.

10.3 - Interferências. - Nas condições descritas neste método, podem também ser eluídos muitos outros compostos, como conservantes e aditivos cosméticos. Os tempos de retenção de um grande número de conservantes mencionados no anexo VI da directiva do Conselho relativa a produtos cosméticos constam da lista incluída em N. de

Kruijf, A. Schouten, M. A. H. Rijk e L. A. Pranato-Soetardhi (1989): Determination of preservatives in cosmetic products, «II - High performance liquid chromatographic identification» (J. Chromatography 469, 317-398).

10.4 - Para proteger a coluna analítica, pode utilizar-se uma pré-coluna apropriada.

10.5 - O método foi investigado num ensaio de colaboração em que participaram nove laboratórios.

Foram analisadas três amostras. O quadro abaixo apresenta, para cada uma das três amostras, uma lista das médias em % m/m (m), as repetibilidades ® e as reprodutibilidades ® das substâncias a analisar que continham:

Amostra	2-fenoxietanol	1-fenoxi-2-propanol	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno	Benzilparabeno
Creme vitaminado.....	m	1,124	0,250	0,0628	0,031	0,0906	
	r	0,016	0,018	0,0035	0,0028	0,0044	
	R	0,176	0,030	0,0068	0,0111	0,0034	
Creme de dia.....	m	1,196	0,266	0,076			
	r	0,040	0,003	0,002			
	R	0,147	0,022	0,004			
Creme para massagens.....	m		0,806		0,180	0,148	0,152
	r		0,067		0,034	0,013	0,015
	R		0,112		0,078	0,012	0,016