

**Portaria n.º 503/94, de 6 de Julho****Métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos e de higiene**

O Decreto-Lei n.º 128/86, de 3 de Junho, ao estabelecer regras que disciplinam o mercado de produtos cosméticos e de higiene corporal, prevê a adopção de um sistema de controlo de qualidade daqueles produtos.

A implementação de um tal sistema reveste-se de manifesta vantagem quer para os industriais, que vêm deste modo os seus produtos prestigiados, quer para os cidadãos, que vêem assim os seus direitos devidamente acautelados.

Pretende-se com este diploma estabelecer métodos de amostragem e de análise que permitam um controlo oficial dos produtos cosméticos e de higiene corporal, de forma a garantir que os princípios e as restrições impostos pelas sucessivas portarias de adaptação ao progresso técnico que neste domínio vêm sendo publicadas são respeitados.

Para além dos objectivos referidos, o presente diploma visa uma harmonização da legislação nacional com as seguintes directivas do Conselho das Comunidades Europeias:

Directiva n.º 80/1335/CEE, de 22 de Dezembro;  
Directiva n.º 82/434/CEE, de 14 de Maio;  
Directiva n.º 83/514/CEE, de 27 de Setembro;  
Directiva n.º 85/490/CEE, de 11 de Outubro;  
Directiva n.º 87/143/CEE, de 10 de Fevereiro;  
Directiva n.º 90/207/CEE, de 4 de Abril.

Assim, nos termos do disposto na 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 Indústria e Energia, da Saúde e do Comércio e Turismo, que o controlo da composição dos produtos cosméticos e de higiene corporal e respectivas matérias-primas seja efectuado de acordo com os métodos de análise constantes do anexo a este diploma e que dele faz parte integrante.

Ministérios da Indústria e Energia, da Saúde e do Comércio e Turismo.

Assinada em 17 de Março de 1994.

O Ministro da Indústria e Energia, Luís Fernando Mira Amaral. - O Ministro da Saúde, Adalberto Paulo da Fonseca Mendo. - O Ministro do Comércio e Turismo, Fernando Manuel Barbosa Faria de Oliveira.

**ANEXO****Métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos****1.ª PARTE****Amostragem dos produtos cosméticos**

1 - Objectivo e campo de aplicação:

O presente documento descreve as modalidades de amostragem dos produtos cosméticos, tendo em vista a sua análise nos diferentes laboratórios.

2 - Definições:

Amostra elementar: unidade levantada num lote destinado a venda.

Amostra global: conjunto de amostras elementares portadoras de um só número de lote.

Amostra de laboratório: parte representativa da amostra global destinada a um laboratório de análises.

Tomada de ensaio: parte representativa da amostra de laboratório necessária para uma análise.

Recipiente: objecto que pode conter um produto e que está em contacto directo e permanente com este produto.

### 3 - Amostragem:

3.1 - Os produtos cosméticos são retirados dos seus acondicionamentos de origem e enviados tal qual aos laboratórios.

3.2 - Para os produtos cosméticos a granel e em unidades que tiverem uma embalagem diferente da embalagem original serão estabelecidas prescrições especiais com vista à amostragem.

3.3 - As normas analíticas e o número de análises a efectuar por cada laboratório determinam o número de amostras elementares necessário para preparar a amostra de laboratório.

### 4 - Identificação de amostras:

4.1 - As amostras colhidas devem ser seladas no local da colheita e devidamente identificadas.

4.2 - Cada amostra elementar deve possuir as indicações seguintes:

Identificação do produto cosmético e de higiene corporal, com referência ao nome e número de lote;

Data, hora e local da colheita;

Nome da pessoa que efectua a colheita;

Nome da entidade que efectua o controlo.

4.3 - Deve ser lavrado um auto de amostragem de acordo com normas estabelecidas.

### 5 - Armazenagem das amostras:

5.1 - As amostras elementares devem ser armazenadas segundo as indicações do fabricante inscritas no rótulo.

5.2 - Na falta de indicações especiais, todas as amostras devem ser guardadas ao abrigo da luz e a temperatura compreendida entre 10°C e 25°C.

5.3 - As amostras elementares só deverão ser abertas no início da análise.

## 2.ª PARTE

### Tratamento das amostras de laboratório

#### 1 - Generalidades:

1.1 - A determinação analítica é efectuada em cada uma das amostras elementares ou, se a quantidade for insuficiente, num número mínimo de amostras elementares previamente homogeneizadas.

1.2 - Abrir o recipiente, sob gás inerte, se o método de análise o especificar, e tirar o número necessário de tomadas de ensaio o mais rapidamente possível. A análise deverá ser efectuada no mais curto prazo de tempo. Se a amostra tiver de ser conservada, tornar a fechar cuidadosamente o recipiente sob gás inerte.

1.3 - Os produtos cosméticos podem apresentar-se em três estados: líquido, pastoso e sólido.

Se os produtos cosméticos, em embalagem de origem, apresentarem separação de fases, devem ser previamente homogeneizados.

1.4 - Se um produto cosmético é acondicionado sob uma forma que torne impossível o seu tratamento em conformidade com as presentes directrizes e que não está prevista nos métodos de análise, pode adoptar-se uma técnica específica, que deverá ser descrita pormenorizadamente no relatório final.

## 2 - Estado líquido:

2.1 - Neste estado encontram-se, nomeadamente, produtos como água de toilette, loção, solução, óleo e leite, os quais podem ser acondicionados em frasco, garrafa, ampola ou bisnaga.

### 2.2 - Tomada de ensaio:

Agitar vigorosamente o recipiente antes de abrir;  
Abrir de acordo com as condições especificadas;  
Deitar alguns mililitros do líquido num tubo de ensaio, a fim de examinar visualmente as suas características com vista à colheita;  
Fechar o recipiente; ou  
Efectuar as tomadas de ensaio necessárias à análise e fechar de novo o recipiente.

## 3 - Estado pastoso:

3.1 - Neste estado encontram-se, nomeadamente, produtos tais como creme, emulsão e gele, os quais podem ser acondicionados em bisnaga, frasco flexível ou boião.

### 3.2 - Tomada de ensaio:

Dois casos são possíveis:

3.2.1 - Recipiente com abertura estreita (bisnaga, frasco flexível). - Eliminar pelo menos o primeiro centímetro do produto a analisar. Efectuar a tomada de ensaio e fechar o recipiente imediatamente.

3.2.2 - Recipiente com abertura larga (boião). - Raspar ligeiramente a superfície, a fim de eliminar a camada superficial. Efectuar a tomada de ensaio e fechar imediatamente o recipiente.

## 4 - Estado sólido:

4.1 - Neste estado encontram-se, nomeadamente, produtos tais como pó, pó compacto, bâton e bloco, que podem ser acondicionados em caixa ou estojo.

### 4.2 - Tomada de ensaio:

Dois casos são possíveis:

4.2.1 - Pó. - Antes de tirar a cápsula ou tampa, agitar o pó o mais vigorosamente possível. Destapar e efectuar a tomada de ensaio.

4.2.2 - Pó compacto, bâton ou bloco. - Eliminar, por leve raspagem, a camada superficial do sólido e efectuar a tomada de ensaio.

## 5 - Produtos acondicionados sob pressão de gás:

5.1 - Estes produtos são definidos no artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 108/92, de 2 de Junho.

### 5.2 - Tomada de ensaio:

Após agitação vigorosa, uma parte representativa do conteúdo do recipiente é transvasada com a ajuda de um dispositivo de recolha para um frasco de vidro plastificado transparente provido de uma válvula. Este frasco não tem tubo mergulhador. Em casos particulares, o método de análise poderá prever outros dispositivos de recolha.

Quatro situações se podem apresentar:

5.2.1 - Se o conteúdo é uma solução homogénea, está pronto para análise.

5.2.2 - Se o conteúdo é constituído por duas fases líquidas, a análise de cada uma das fases pode ser efectuada após transferência da fase inferior para um segundo frasco. Esta fase é muitas vezes aquosa e já não contém gás propulsor (caso butano/água). Neste caso, aquando da transferência, o colo do frasco deve ser orientado para baixo (figura 4).

5.2.3 - Se o conteúdo é constituído por pó em suspensão, pode analisar-se a fase líquida após a separação do pó.

5.2.4 - Se o conteúdo é constituído por espuma, introduzir previamente no frasco de colheita uma quantidade conhecida, por pesagem de 2-metoxi-etanol (5 g a 10 g). Aquando da degaseificação, o 2-metoxi-etanol impede a formação de espuma, sendo assim já possível separar os gases propulsores sem perder líquido.

5.3 - Aparelhagem:

O dispositivo de recolha (figura 1) é fabricado em duralumínio ou latão. Este dispositivo, descrito a título de exemplo, é concebido para se adaptar aos diferentes tipos de válvula, por intermédio de uma ligação em polietileno.

Outros dispositivos de recolha podem ser utilizados (figuras 2 e 3).

O dispositivo de recolha é de vidro branco revestido exteriormente de uma protecção plastificada transparente. A sua capacidade é de 50 ml a 100 ml. É equipado com uma válvula e não tem tubo mergulhador (figura 4).

5.4 - Técnica:

Para transferir uma quantidade suficiente de produto, é necessário libertar o frasco de colheita do ar que contém. Para isso, e com a ajuda do dispositivo de recolha, introduzir cerca de 10 ml de diclorodifluorometano ou de butano, consoante a natureza do produto a examinar. A seguir, degaseificar totalmente até desaparecimento da fase líquida, sendo o frasco mantido com a válvula para cima. Retirar o dispositivo de recolha e tarar o frasco de colheita (a) em gramas. Agitar vigorosamente o recipiente do qual se deve retirar a amostra. Adaptar o dispositivo de recolha à válvula do recipiente, colocado com a válvula para cima, adaptar o frasco da colheita, o colo para baixo, no dispositivo de recolha e carregar. Encher o frasco de colheita até cerca de dois terços.

Se a transferência parar prematuramente devido ao equilíbrio das pressões, é possível prosseguir arrefecendo o frasco de colheita. Retirar o dispositivo de recolha e pesar o frasco (b), em gramas, a fim de determinar a massa do produto transferido ( $m_I$ ) ( $m_I = b - a$ ).

A amostra assim obtida pode ser utilizada:

Para a análise química habitual;

Para uma análise das substâncias voláteis por cromatografia em fase gasosa.

5.4.1 - Análise química:

Efectuar as operações seguintes, mantendo o frasco de colheita com o colo para cima:

Desgaseificar. Se a desgaseificação provocar a formação de espuma, utilizar um frasco de colheita contendo uma quantidade exactamente pesada de 2-metoxi-etanol (5 g a 10 g), introduzida por meio de uma seringa, por intermédio do dispositivo de recolha;

Terminar a eliminação quantitativa das substâncias voláteis, agitar num banho termostatado a 40°C. Retirar o dispositivo de recolha;

Pesar ( $c$  gramas), a fim de determinar a massa do resíduo ( $m_2$ ), sendo  $m_2 = c - a$ . Para o cálculo do peso do resíduo, ter em consideração a quantidade de 2-metoxi-etanol introduzida, se for caso disso;

Abrir o frasco, retirando-lhe a válvula;

Dissolver quantitativamente o resíduo numa quantidade conhecida de solvente apropriado;

Efectuar o doseamento considerado numa parte alíquota.

$$R = \frac{r \cdot m_2}{m_1} \text{ e } Q = \frac{R \cdot P}{100}$$

em que:

$m_1$  = massa de produto transferido para o frasco de recolha;

$m_2$  = massa do resíduo após aquecimento a 40°C;

$r$  = percentagem da substância doseada em  $m_2$ , determinada por método apropriado;

$R$  = percentagem da substância doseada na totalidade do produto;

$Q$  = quantidade total absoluta da substância doseada na totalidade do produto;

$P$  = massa líquida do produto total acondicionado antes do início das operações.

#### 5.4.2 - Análise das substâncias voláteis por cromatografia em fase gasosa:

##### 5.4.2.1 - Princípio:

Do frasco de colheita, retirar a quantidade de líquido apropriada com a seringa de gases e injectar o conteúdo da seringa no cromatógrafo.

##### 5.4.2.2 - Aparelhagem:

Seringa de gases (figura 5). *Precision sampling series A2*, ou seringa equivalente.

- Esta seringa tem uma válvula corrediça na sua extremidade-agulha. A ligação da seringa ao frasco de colheita é efectuada por meio de um adaptador do lado do frasco e de um tubo em polietileno do lado da seringa com 8 mm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro.

##### 5.4.2.3 - Técnica:

Após ter transferido uma quantidade apropriada do produto para o frasco de colheita, por meio do dispositivo de recolha, adaptar a seringa ao frasco de colheita, tal como indicado no n.º 5.4.2.2. Com a válvula na posição aberta, aspirar uma quantidade apropriada de líquido. Eliminar as bolhas gasosas por vaivém sucessivo do pistão, arrefecendo a seringa, se necessário. Logo que o líquido contido na seringa não apresentar bolhas, fechar a válvula e puxar a seringa para fora do frasco de colheita. Adaptar uma agulha e, após introdução no injector do cromatógrafo, abrir a válvula e injectar.

##### 5.4.2.4 - Padrão interno:

Se for necessário, utilizar um padrão interno. Este pode ser introduzido no frasco de colheita por meio de uma seringa, por intermédio do dispositivo de recolha.

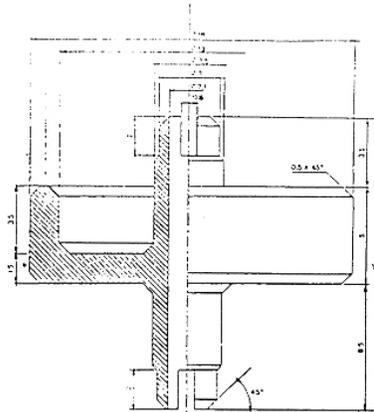


Fig. 1  
Dispositivo de recolha

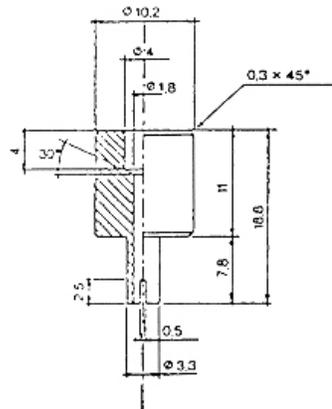


Fig. 2  
Tubo de ligação M2—Ajustado por  
uma válvula que apresenta uma  
extremidade macho e uma válvula que  
apresenta uma extremidade fêmea

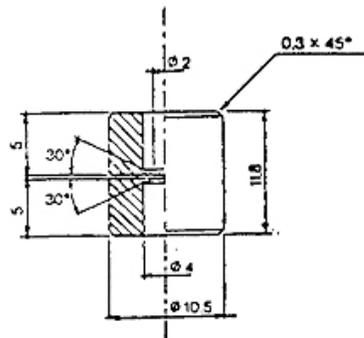


Fig. 3  
Tubo de ligação M1—Ajustado por  
duas válvulas que apresentam uma  
extremidade macho



Fig. 4  
Frasco da colheita — Capacidade: 50  
ml a 100 ml



Fig. 5  
Seringa de gases

### 3.<sup>A</sup> PARTE

#### Ensaio

#### CAPÍTULO I

#### Ácido fenolsulfónico - Identificação e doseamento

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve a identificação e o doseamento do ácido fenolsulfónico nos produtos cosméticos, tais como aerossóis e loções faciais.

##### 2 - Definição:

O teor da amostra em ácido fenolsulfónico determinado segundo este método é expresso em percentagem de massa de fenolsulfonato de zinco anidro.

##### 3 - Princípio:

A amostra destinada ao exame é concentrada, sob pressão reduzida, dissolvida em água e purificada por extracção com clorofórmio. O doseamento do ácido fenolsulfónico é efectuado por bromiodometria numa alíquota da solução aquosa filtrada.

##### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Ácido clorídrico concentrado a 36% ( $d_4^{20} = 1,18$ )

4.2 - Clorofórmio.

4.3 - 1-butanol.

4.4 - Ácido acético glacial.

4.5 - Iodeto de potássio.

4.6 - Brometo de potássio.

4.7 - Carbonato de sódio.

4.8 - Ácido sulfanílico.

4.9 - Nitrito de sódio.

4.10 - Solução de bromato de potássio 0,1 N.

4.11 - Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N.

4.12 - Solução aquosa de amido a 1% (m/v).

4.13 - Solução aquosa de carbonato de sódio a 2% (m/v).

4.14 - Solução aquosa de nitrito de sódio a 4,5% (m/v).

4.15 - Solução de ditizona a 0,05% (m/v) em clorofórmio.

4.16 - Eluente: 1-butanol, ácido acético glacial, água (4:1:5, em volume). Após mistura numa ampola de decantação, elimina-se a fase inferior.

4.17 - Reagente de Pauly:

Dissolver, aquecendo, 4,5 g de ácido sulfanílico (4.8) em 45 ml de ácido clorídrico concentrado (4.1) e diluir

com água até 500 ml. Deixar arrefecer 10 ml da solução num recipiente com água gelada e acrescentar 10 ml, agitando, de uma solução fria de nitrito de sódio (4.14).

Deixar repousar esta mistura durante quinze minutos a 0°C (a esta temperatura, a solução é estável durante um a três dias) e acrescentar 20 ml de solução de carbonato de sódio

(4.13) antes de pulverização.

4.18 - Placas de celulose já preparadas para a cromatografia em camada fina, formato 20 cm x 20 cm; espessura da camada absorvente: 0,25 mm.

5 - Aparelhagem:

5.1 - Balões de fundo redondo de 100 ml.

5.2 - Ampola de decantação de 100 ml.

5.3 - Matrases de 250 ml.

5.4 - Bureta de 25 ml.

5.5 - Pipetas com capacidades de 1 ml, 2 ml e 10 ml.

5.6 - Pipeta graduada de 5 ml.

5.7 - Seringa para injeção de 10 µl, graduada a um décimo de microlitro.

5.8 - Termómetro graduado de 0°C a 100°C.

5.9 - Banho-maria, termostatado.

5.10 - Estufa bem ventilada e regulada a 80°C.

5.11 - Acessórios usuais para a cromatografia em camada fina.

6 - Preparação da amostra:

Para identificação e doseamento do ácido fenolsulfónico nos aerossóis como são descritos abaixo, utiliza-se o resíduo obtido, depois de libertar o conteúdo do aerossol dos solventes e propulsores que são voláteis sob uma pressão normal.

7 - Identificação:

7.1 - Em seis pontos da linha de partida situada a 1 cm da parte de baixo da placa de celulose (4.18) pôr sucessivamente, por meio de uma seringa para injeção (5.7), 5 µl do resíduo (6) ou da amostra.

7.2 - Colocar a placa numa tina contendo já o solvente de desenvolvimento (4.16) e esperar que a frente do solvente tenha atingido uma linha situada a 15 cm da linha de partida.

7.3 - Retirar a placa da tina e secar a 80°C até à evaporação total do ácido acético. Pulverizar a placa com solução de carbonato de sódio (4.13) e deixar secar ao ar.

7.4 - Cobrir metade da placa com uma placa de vidro e pulverizar com a solução de ditizona a 0,05% (4.15) sobre a metade não coberta. Em presença de iões zinco, manchas vermelhas-lilás aparecem no cromatograma.

7.5 - Cobrir de seguida com uma placa de vidro a metade da placa que recebeu a pulverização de ditizona e pulverizar com o reagente de Pauly (4.17) sobre a outra metade; em presença de ácido fenolsulfónico, aparecem no cromatograma uma mancha castanha-amarelada (ácido p-fenolsulfónico) com um valor de Rf vizinho de 0,26 e uma mancha amarela (ácido m-fenolsulfónico) com um valor de Rf vizinho de 0,45.

#### 8 - Doseamento:

8.1 - Pesar 10 g de amostra ou de resíduo (6) num balão com fundo redondo de 100 ml e concentrar a vácuo por meio de evaporador rotativo em banho-maria a 40°C.

8.2 - Com uma pipeta, deitar 10 ml de água (V1) num balão e dissolver o resíduo de evaporação (8.1) a quente.

8.3 - Transferir quantitativamente a solução para uma ampola de decantação (5.2) e extrair por duas vezes com 20 ml de clorofórmio (4.2). Após cada extracção, rejeitar a fase clorofórmica.

8.4 - Filtrar a solução aquosa através de um filtro de pregas. Em função do teor previsto em ácido fenolsulfónico, pipetar 1 ml ou 2 ml (V2) do filtrado para um matrás de 250 ml (5.3) e diluir com água até obtenção de 75 ml da solução.

8.5 - Juntar 2,5 ml de ácido clorídrico a 36% (4.1) e 2,5 g de bromato de potássio (4.6), misturar e aquecer a solução a 50°C em banho-maria.

8.6 - Por meio de uma bureta, juntar a quantidade de solução de bromato de potássio 0,1 N (4.10) necessária para a coloração da solução passar a amarelo, mantendo a temperatura a 50°C.

8.7 - Juntar 3 ml de solução de bromato de potássio (4.10), fechar e colocar dez minutos em banho-maria a 50°C. Se, passados estes dez minutos, a coloração desapareceu, acrescentar ainda 2 ml de solução de bromato de potássio (4.10) e colocar de novo o frasco rolhado durante dez minutos suplementares em banho-maria a 50°C. Anotar a quantidade total de solução de bromato de potássio acrescentada (a).

8.8 - Arrefecer a solução à temperatura ambiente, juntar 2 g de iodeto de potássio (4.5) e misturar.

8.9 - Por meio de uma solução de tiosulfato de sódio 0,1 N (4.11), titular o iodo libertado. No fim da titulação, juntar algumas gotas de solução de amido (4.12) como indicador. Anotar a quantidade de tiosulfato de sódio utilizada (b).

#### 9 - Cálculo:

Calcular o teor em fenossulfonato de zinco da amostra ou do resíduo (6) em percentagem de massa (m/m) por meio da fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de fenossulfato de zinco} = \frac{(a-b) \cdot V_1 \cdot 0,00514 \cdot 100}{m \cdot V_2}$$

- $a$  = quantidade total, em mililitros, de solução de bromato de potássio 0,1 N acrescentada (8.7);
- $b$  = quantidade, em mililitros, de solução de tiosulfato de sódio 0,1 N utilizada aquando da titulação (8.9);
- $m$  = quantidade de amostra ou de resíduos examinados (8.1) (em miligramas);
- $V_1$  = volume, em mililitros, da solução obtida no n.º 8.2;
- $V_2$  = volume, em mililitros, do resíduo de evaporação dissolvido utilizado para exame (8.4).

*Nota:* No caso dos aerossóis, o resultado das determinações em percentagem (m/m) o resíduo (6) deve ser convertido em percentagem do produto de origem.

#### 10 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de cerca de 5% de fenolsulfonato de zinco, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,5%.

#### 11 - Interpretação dos resultados:

Nos termos das disposições legais relativas aos produtos cosméticos, as loções faciais e os desodorizantes podem conter, no máximo, 6% (m/m) de fenolsulfonato de zinco. Por esta razão, é necessário determinar não só o teor em ácido fenolsulfónico, mas também o teor em zinco. Se se multiplicar pelo coeficiente 0,1588 o teor em fenolsulfonato de zinco calculado no n.º 9, obtém-se o teor mínimo em zinco do produto, em percentagem (m/m), tal como resulta do teor obtido em ácido fenolsulfónico. O teor efectivo em zinco determinado por processos gravimétricos e reportado às disposições específicas é, todavia, susceptível de ser mais elevado, pois os produtos cosméticos podem igualmente conter cloreto e sulfato de zinco.

## CAPÍTULO II

### **Ácido oxálico e seus sais alcalinos nos produtos capilares - Doseamento e identificação**

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método abaixo indicado é adaptado ao doseamento e à identificação do ácido oxálico e dos seus sais alcalinos nos produtos capilares. Pode ser utilizado nas soluções e loções incolores aquosas ou hidroalcoólicas que contêm cerca de 5% de ácido oxálico ou uma proporção equivalente de oxalato alcalino.

#### 2 - Definição:

O teor da amostra em ácido oxálico e ou em sais alcalinos deste ácido, determinado segundo este método, é expresso em percentagem de massa (m/m) de ácido oxálico.

#### 3 - Princípio:

Após ter eliminado os produtos tensoactivos aniónicos eventuais com a ajuda de cloridrato de p-toluidina, precipita-se o ácido oxálico e ou os oxalatos sob a forma de oxalato de cálcio e filtra-se a solução. O precipitado é de seguida dissolvido em ácido sulfúrico e titulado com permanganato de potássio.

#### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

- 4.1 - Solução de acetato de amónio a 5% (m/m).
- 4.2 - Solução de cloreto de cálcio a 10% (m/m).
- 4.3 - Etanol a 95% (v/v).
- 4.4 - Tetracloreto de carbono.
- 4.5 - Éter.
- 4.6 - Solução de cloridrato de p-toluidina a 6,8% (m/m).
- 4.7 - Solução de permanganato de potássio 0,1 N.
- 4.8 - Ácido sulfúrico a 20% (m/m).
- 4.9 - Ácido clorídrico a 10% (m/m).
- 4.10 - Acetato de sódio 3 H<sub>2</sub>O.
- 4.11 - Ácido acético glacial.
- 4.12 - Ácido sulfúrico (1:1).
- 4.13 - Solução saturada de hidróxido de bário.

#### 5 - Aparelhagem:

- 5.1 - Ampolas de decantação de 500 ml.
- 5.2 - Copos de vidro de 50 ml e 600 ml.
- 5.3 - Cadinhos filtrantes de vidro G-4.
- 5.4 - Provetas graduadas de 25 ml e 100 ml.
- 5.5 - Pipetas de 10 ml.
- 5.6 - Frascos para filtração sob vácuo de 500 ml.
- 5.7 - Trompa de água.
- 5.8 - Termómetro graduado de 0°C a 100°C.
- 5.9 - Agitador magnético com aquecimento.
- 5.10 - Magnetos revestidos de *teflon*.
- 5.11 - Bureta de 25 ml.
- 5.12 - Matrases de 250 ml.

#### 6 - Técnica:

6.1 - Pesar 6 g a 7 g da amostra num copo de vidro de 50 ml; levar o pH a 3, com a ajuda de ácido clorídrico diluído (4.9). Transferir a solução, com ajuda de 100 ml de água destilada, para uma ampola de decantação. Juntar, de seguida, 25 ml de etanol (4.3), 25 ml de solução de cloridrato de p-toluidina (4.6) e 25 ml a 30 ml de tetracloreto de carbono (4.4) e agitar vigorosamente a mistura.

6.2 - Após separação das fases, rejeitar a camada inferior (fase orgânica); repetir a extracção com a ajuda dos reagentes utilizados no n.º 6.1 e rejeitar de novo a fase orgânica.

6.3 - Transferir a solução aquosa para um copo de vidro de 600 ml e eliminar o tetracloreto de carbono residual, levando a solução à ebulição.

6.4 - Juntar 50 ml de solução de acetato de amónio (4.1), levar a solução à ebulição (5.9) e juntar 10 ml de solução quente de cloreto de cálcio (4.2) à solução fervente, continuando a agitar, a fim de formar o precipitado.

6.5 - Verificar se a precipitação é completa, juntando algumas gotas de solução de cloreto de cálcio (4.2). Deixar arrefecer à temperatura ambiente. Juntar, agitando (5.10), 200 ml de etanol (4.3) e deixar repousar durante trinta minutos.

6.6 - Filtrar o líquido por cadinho filtrante de vidro (5.3). Transferir o precipitado para o cadinho filtrante com uma pequena quantidade de água quente (50°C a 60°C) e lavar o precipitado com água fria.

6.7 - Lavar o precipitado cinco vezes seguidas com um pouco de etanol (4.3) e de éter (4.5). Dissolver o precipitado em 50 ml de ácido sulfúrico quente (4.8), aspirando este último através do cadinho filtrante.

6.8 - Transferir quantitativamente a solução para um matrás (5.12) e titular com a ajuda de uma solução de permanganato de potássio (4.7) até à obtenção de uma fraca coloração rósea.

7 - Cálculo:

O teor da amostra expresso em ácido oxálico, em percentagem de massa (m/m), é calculado pela fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de ácido oxálico} = \frac{A \cdot 4,50179 \cdot 100}{E \cdot 1000}$$

na qual:

$A$  = volume (em mililitros) de percentagem de potássio 0,1 N gastos no n.º 6.8;

$E$  = quantidade da amostra utilizada no n.º 6.1, em gramas (8.9);

4,50179 = coeficiente de conversão para o ácido oxálico.

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em ácido oxálico da ordem dos 5% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,15%.

9 - Identificação:

9.1 - Princípio:

O ácido oxálico e ou os oxalatos são precipitados sob a forma de oxalato de cálcio e dissolvidos em ácido sulfúrico. Junta-se de seguida um pouco de solução de permanganato de potássio; este decora e foma-se dióxido de carbono. O dióxido de carbono formado em contacto com uma solução de barita provoca a formação de um precipitado branco opaco de carbonato de bário.

9.2 - Técnica:

9.2.1 - Submeter uma parte da amostra a examinar ao tratamento indicado nos n.ºs 6.1 a 6.3, a fim de eliminar os produtos tensoactivos que possa conter.

9.2.2 - A cerca de 10 ml da solução obtida no n.º 9.2.1 juntar um pouco de acetado de sódio (4.10) na ponta da espátula e acidificar a solução com algumas gotas de ácido acético glacial (4.11).

9.2.3 - Juntar à solução de cloreto de cálcio a 10% (4.2) e filtrar a solução obtida. Dissolver o precipitado de oxalato de cálcio em 2 ml de ácido sulfúrico (1:1) (4.12).

9.2.4 - Transferir a solução para um tubo de ensaio e acrescentar gota a gota cerca de 0,5 ml de solução de permanganato de potássio 0,1 N (4.7). Na presença de oxalato, a solução decora, primeiro lentamente, depois rapidamente.

9.2.5 - Logo após a adição do permanganato de potássio, colocar em cima do tubo de ensaio um pequeno tubo de vidro de dimensão adequada e provido de uma rolha; aquecer ligeiramente o conteúdo e recolher o anidrido carbónico formado numa solução saturada de hidróxido de bário (4.1.3). A formação de uma nuvem leitosa de carbonato de bário, passados três a quatro minutos, indica a presença de ácido oxálico.

### CAPÍTULO III

#### **Ácido tioglicólico nos produtos para a frisagem ou a desfrisagem dos cabelos e nos depilatórios – Identificação e doseamento.**

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve a identificação e o doseamento do ácido tioglicólico nos produtos para a frisagem ou desfrisagem dos cabelos e nos depilatórios, em presença de outros redutores eventuais.

##### 2 - Definição:

O teor da amostra em ácido tioglicólico, determinado segundo este método, é expresso em percentagem de ácido tioglicólico (m/m).

##### 3 - Princípio:

O ácido tioglicólico é identificado quer por reacção corada, quer por cromatografia em camada fina. O seu doseamento é efectuado quer por iodometria, quer por cromatografia em fase gasosa.

##### 4 - Identificação:

###### 4.1 - Identificação por via química.

###### 4.1.1 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

###### 4.1.1.1 - Papel de acetado de chumbo (II).

###### 4.1.1.2 - Solução de ácido clorídrico 1:1.

###### 4.1.2 - Técnica:

4.1.2.1 - Identificação do ácido tioglicólico por reacção corada com acetato de chumbo (II). Aplicar uma gota da amostra a analisar sobre papel de acetato de chumbo (II) (4.1.1.1). Se se obtiver uma coloração amarela-intensa, é provável a presença de ácido tioglicólico.

Sensibilidade: 0,5%

4.1.2.2 - Caracterização dos sulfuretos por formação de  $H_2S$  após reacção em meio ácido:

Num tubo de ensaio introduzir alguns miligramas da amostra a estudar. Juntar 2 ml de água destilada e 1 ml de HCl 1:1 (4.1.1.2).

Verifica-se uma libertação de  $H_2S$ , que se reconhece pelo seu cheiro e pela formação de precipitado negro de PbS sobre um papel de acetato de chumbo (II) (4.1.1.1).

Sensibilidade: 50 ppm.

4.1.2.3 - Caracterização dos sulfitos por formação de  $SO_2$  após reacção em meio ácido. Proceder como no n.º 4.1.2.2. Levar à ebulição. O  $SO_2$  reconhece-se pelo cheiro e pelas propriedades redutoras sobre o  $MnO_4$ , por exemplo.

###### 4.2 - Identificação por cromatografia em camada fina.

###### 4.2.1 - Reagentes:

Todos os reagentes, salvo indicação em contrário, devem ser de qualidade analítica.

###### 4.2.1.1 - Ácido tioglicólico controlado iodometricamente; pureza: $\geq 98\%$ (ATG).

###### 4.2.1.2 - Ácido ditioglicólico; pureza: $\geq 99\%$ (ADTG).

###### 4.2.1.3 - Ácido tioláctico; pureza: $\geq 95\%$ (ATL).

###### 4.2.1.4 - Ácido 3-mercaptopropiónico; pureza: $\geq 98\%$ (AMP).

- 4.2.1.5 - 1-tioglicerol; pureza:  $\geq 98\%$  (TG).
- 4.2.1.6 - Gele de sílica GHR ou placas pré-preparadas correspondentes, de 0,25 mm de espessura, activadas a 110°C durante trinta minutos.
- 4.2.1.7 - Óxido de alumínio F 254, tipo E Merck, ou equivalente, ou placas prontas para utilização, de 0,25 mm de espessura.
- 4.2.1.8 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,19$ ).
- 4.2.1.9 - Acetato de etilo.
- 4.2.1.10 - Clorofórmio.
- 4.2.1.11 - Éter di-isopropílico.
- 4.2.1.12 - Tetracloroeto de carbono.
- 4.2.1.13 - Ácido acético glacial.
- 4.2.1.14 - Solução aquosa de iodeto de potássio a 1% (m/v).
- 4.2.1.15 - Solução aquosa de cloreto de platina a 0,1% (m/v).
- 4.2.1.16 - Eluentes:
- 4.2.1.16.1 - Acetato de etilo, clorofórmio, éter di-isopropílico, ácido acético glacial (20:20:10:10, em volume).
- 4.2.1.16.2 - Clorofórmio, ácido acético glacial (90:20, em volume).
- 4.2.1.17 - Reveladores:
- 4.2.1.17.1 - Misturar directamente antes da utilização volumes iguais da solução 4.2.1.14 e da solução 4.2.1.15.
- 4.2.1.17.2 - Solução de bromo a 5% (m/v):  
Dissolver 5 g de bromo em 100 ml de  $CCl_4$  (4.2.1.12).
- 4.2.1.17.3 - Solução de fluoresceína a 0,1% (m/v):  
Dissolver 100 mg de fluoresceína em 100 ml de etanol a 95%.
- 4.2.1.17.4 - Solução aquosa de heptamolíbdate de hexa-amónio a 10% (m/v).
- 4.2.1.18 - Soluções padrão:
- 4.2.1.18.1 - Solução aquosa de ácido tioglicólico a 0,4% (m/v).
- 4.2.1.18.2 - Solução aquosa de ácido ditiodiglicólico a 0,4% (m/v).
- 4.2.1.18.3 - Solução aquosa de ácido tioláctico a 0,4% (m/v).
- 4.2.1.18.4 - Solução aquosa de ácido 3-mercaptopropiónico a 0,4% (m/v).
- 4.2.1.18.5 - Solução aquosa de 1-tioglicerol a 0,4% (m/v).
- 4.2.2 - Aparelhagem:  
Material corrente de laboratório para cromatografia em camada fina.
- 4.2.3 - Técnica:
- 4.2.3.1 - Tratamento das amostras:  
Acidificar com algumas gotas de ácido clorídrico 4.2.1.8 até pH = 1 e filtrar, se for necessário. Em certos casos, pode ser necessário diluir a amostra. Neste caso, acidificá-la pelo ácido clorídrico antes de efectuar a diluição.
- 4.2.3.2 - Desenvolvimento:  
Aplicar na placa 1  $\mu$ l da solução da amostra 4.2.3.1 e 1  $\mu$ l de cada uma das cinco soluções padrão (4.2.1.18). Secar cuidadosamente sob corrente fraca de azoto e desenvolver com os eluentes 4.2.1.16.1 ou 4.2.1.16.2. Secar o mais rapidamente possível sob azoto, de modo a evitar a oxidação dos tióis.
- 4.2.3.3 - Revelação:  
Pulverizar a placa com o reagente 4.2.1.17.1, ou 4.2.1.17.3, ou 4.2.1.17.4. Quando a placa for pulverizada com o reagente 4.2.1.17.3, colocá-la numa tina saturada de bromo (4.2.1.17.2) até que as manchas fiquem visíveis. Quando a placa for pulverizada com o reagente 4.2.1.17.4, a revelação apenas será apropriada se o tempo de secagem da camada não ultrapassar meia hora.
- 4.2.3.4 - Leitura:

Comparar os valores dos Rf e a cor das soluções padrão com os da solução da amostra. Os Rf médios em camada de sílica são dados abaixo, a título indicativo, e apenas têm valor comparativo. Com efeito, dependem:

Do estado de activação da placa no momento da cromatografia;  
Da temperatura da tina de cromatografia.

#### Quadro dos Rf obtidos em camada de sílica

	Eluentes	
	4.2.1.16.1	4.2.1.16.2
Ácido tioglicólico.....	0,25	0,80
Ácido tioláctico.....	0,40	0,95
Ácido ditiodiglicólico.....	0,00	0,35
Ácido 3-mercaptopropiónico.....	0,45	0,95
1-tioglicerol.....	0,45	0,35

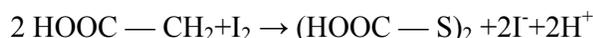
#### 5 – Doseamento (\*):

Começa sempre por uma iodometria.

##### 5.1 - Iodometria:

##### 5.1.1 - Princípio:

O doseamento efectua-se por oxidação do grupo *SH* por  $I_2$  em meio ácido, segundo a equação:



##### 5.1.2 - Reagentes:

Solução aferida de iodo 0,1 N.

##### 5.1.3 - Aparelhagem:

Material corrente de laboratório.

##### 5.1.4 - Técnica:

Num matrás com rolha, de 150 ml, contendo 50 ml de água destilada, pesar com exactidão de 0,500 g a 1 g de amostra. Juntar 5 ml de HCl 1:1 (4.1.1.2) (pH da solução próximo de 0) e titular pelo iodo 0,1 N (5.1.2) até ao aparecimento de uma coloração amarela. Pode utilizar-se um indicador, nomeadamente amido.

##### 5.1.5 - Cálculo:

O teor em ácido tioglicólico é calculado segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de ácido tioglicólico} = \frac{92 \cdot n \cdot 100}{1000 \cdot 10 \cdot m} = \frac{0,92 n}{m}$$

em que:

$m$  = massa, em gramas, da tomada de ensino;

$n$  = o volume de iodo 0,1 N gasto.

5.1.6 - Nota. - Se o resultado, calculado em ácido tioglicólico, for inferior em 0,1% às concentrações máximas autorizadas, não é necessário efectuar outros

(\*) O doseamento do ácido tioglicólico deve fazer-se sobre os produtos ainda não utilizados e destapados recentemente, de modo a evitar a oxidação

doseamentos. Se o resultado for igual ou superior às concentrações máximas autorizadas e se a identificação mostrou a presença de vários redutores, é então necessário efectuar o doseamento por cromatografia em fase gasosa.

#### 5.2 - Cromatografia em fase gasosa:

##### 5.2.1 - Princípio:

O ácido tioglicólico é separado do excipiente por precipitação sob forma de acetato de cádmio (II). Após metilação pelo diazometano preparado, quer extemporaneamente, quer previamente em solução etérea, o derivado metilado do ácido tioglicólico é doseado por cromatografia gás/líquido com caprilato de metilo como padrão interno.

##### 5.2.2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

##### 5.2.2.1 - Ácido tioglicólico puro, de título conhecido.

##### 5.2.2.2 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,19$ )

##### 5.2.2.3 - Metanol.

##### 5.2.2.4 - Solução aquosa de acetato de cádmio (II) di-hidratado a 10% (m/v).

##### 5.2.2.5 - Solução de caprilato de metilo a 2% (m/v) em metanol.

##### 5.2.2.6 - Solução tampão de acetato de pH 5:

Acetato de sódio, 3 H<sub>2</sub>O: 77 g;

Ácido acético glacial: 27,5 ml;

Água desmineralizada q. b. p.: 1 l.

##### 5.2.2.7 - Solução recentemente preparada de ácido clorídrico 3 N em metanol.

##### 5.2.2.8 - N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina.

##### 5.2.2.9 - Solução de hidróxido de sódio 5 N.

##### 5.2.2.10 - Solução titulada de iodo 0,1 N.

##### 5.2.2.11 - Óxido de dietilo.

5.2.2.12 - Solução de diazometano preparada a partir de N-metil-N-nitroso p-tolueno-sulfonamida segundo Fieser (*Reagents for Organic Synthesis*, Ed. Wiley, 1967). A solução obtida contém cerca de 1,5 g de diazometano em 100 ml de óxido de dietilo (5.2.2.11).

Sendo o diazometano um gás tóxico e muito instável, é necessário efectuar todos os ensaios em *hotte* e evitar a utilização de aparelhos que tenham as juntas esmeriladas.

##### 5.2.3 - Aparelhagem:

##### 5.2.3.1 - Material corrente de laboratório:

5.2.3.2 - Aparelho para preparação extemporânea de diazometano (An. chem., 1973, 45,2302).

##### 5.2.3.3 - Aparelho para preparação prévia do diazometano segundo Fieser.

##### 5.2.4 - Preparação da amostra:

Num tubo de centrífuga de 50 ml, pesar com exactidão uma massa de amostra tal que a quantidade suposta de ácido tioglicólico seja da ordem de 50 mg a 70 mg. Acidificar com algumas gotas de HCl concentrado (5.2.2.2), até à obtenção de um pH próximo de 3.

Juntar 5 ml de água desmineralizada e 10 ml de solução tampão de acetato (5.2.2.6). Verificar, por meio de um papel indicador, se o pH está próximo de 5. De seguida juntar 5 ml de solução de acetato de cádmio (II) (5.2.2.4).

Esperar dez minutos e centrifugar pelo menos durante quinze minutos a 4000 rpm. Separar o produto sobrenadante. Pode acontecer que este contenha uma gordura

insolúvel, nomeadamente no caso de um creme, e esta última não pode ser confundida com mercaptido de cádmio acumulado de modo compacto no fundo do tubo.

Verificar a ausência de precipitação aquando da adição ao líquido sobrenadante de algumas gotas de solução de acetato de cádmio (II) (5.2.2.4).

Quando as identificações precedentes tenham demonstrado a ausência de agentes redutores além dos tióis, verificar, por iodometria, se a presença de tióis no produto sobrenadante não excede 6% a 8% da quantidade inicial.

No tubo de centrífuga que contém o precipitado introduzir 10 ml de metanol (5.2.2.3), espalhar finamente o precipitado com a ajuda de uma vareta e centrifugar de novo durante, pelo menos, quinze minutos a 4000 rpm.

Decantar o produto sobrenadante e verificar por iodometria a ausência de tióis.

Uma segunda lavagem é efectuada nas mesmas condições.

Sempre no tubo de centrífuga, juntar:

2 ml de solução de caprilato de metilo (5.2.2.5);

5 ml de solução de ácido clorídrico em metanol (5.2.2.7).

Dissolver completamente o mercaptido (pode acontecer que permaneça um ligeiro resíduo insolúvel devido ao excipiente). Obém-se a solução S. Sobre uma alíquota da solução S, verificar iodometricamente o teor em tióis, que deve ser pelo menos igual a 90% do que foi obtido no n.º 5.1.

5.2.5 - Metilação:

A metilação é efectuada ou extemporaneamente, segundo o processo descrito no n.º 5.2.5.1, ou com a ajuda de uma solução de diazometano, previamente preparada segundo o n.º 5.2.5.2.

5.2.5.1 - Metilação extemporânea:

No aparelho (5.2.3.2) que contém 1 ml de óxido de dietilo (5.2.2.11) introduzir 50 µl da solução S. Metilar, segundo o método referenciado no n.º 5.2.3.2, com 300 mg de N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina (5.2.2.8). Passados quinze minutos, verificar se a solução contém um excesso de diazometano (solução amarela) e transferir para um balão de 2 ml fechado hermeticamente. Colocar este no frigorífico durante uma noite.

Fazer simultaneamente duas metilações.

5.2.5.2 - Metilação com a solução previamente preparada de diazometano (5.2.2.12):

Num frasco com rolha de 5 ml introduzir 1 ml de diazometano (5.2.2.12) e, seguidamente, 50 µl da solução S. Deixar no frigorífico durante uma noite.

5.2.6 - Preparação do padrão:

Preparar uma solução padrão de ácido tioglicólico de título conhecido, contendo cerca de 60 mg de ácido tioglicólico num volume de 2 ml. Obém-se a solução E. Efectuar a precipitação, os doseamentos e a metilação como indicado nos n.os 5.2.4 e 5.2.5.

5.2.7 - Condições da cromatografia em fase gasosa:

5.2.7.1 - Coluna:

Natureza: ácido inoxidável;

Comprimento: 2 m;

Diâmetro: 3 mm.

5.2.7.2 - Enchimento:

Ftalato de dodecilo a 20%/Chrom. WAW 80-100 *mesh*.

## 5.2.7.3 - Detector:

Ionização de chama. É conveniente que o electrómetro seja calibrado para uma sensibilidade de  $8 \times 10^{-10}$  A.

## 5.2.7.4 - Gás:

Gás de arrastamento: azoto.

Pressão: 2,2 b.

Débito: 35 ml/min.

Gás auxiliar: hidrogénio.

Pressão: 1,8 b.

Débito: 15 ml/min.

Detector: gás recomendado pelo fabricante.

## 5.2.7.5 - Temperaturas:

Injector: 200°C;

Detector: 200°C;

Coluna: 90°C.

## 5.2.7.6 - Registador:

Velocidade: 5 mm/min.

## 5.2.7.7 - Quantidade injectada: 3 µl.

Fazer cinco ensaios com cada amostra metilada.

5.2.7.8 - As condições da cromatografia são dadas a título indicativo, podendo ser adaptadas de modo que a resolução para o pico do ácido tioglicólico seja  $R \geq 1,5$ , entendendo-se que:

$$R = 2 \cdot \frac{d' r_2 - d' r_1}{W_1 + W_2}$$

$R_1$  e  $R_2$  = tempo de retenção em minutos;

$W_1$  e  $W_2$  = largura dos picos a meia altura em milímetros;

$d'$  = velocidade de desenrolamento do papel em milímetros/minuto.

É aconselhável terminar a cromatografia, com programação de temperatura de 90°C a 150°C, a 10°C/min., a fim de eliminar as substâncias que podem interferir nos ensaios seguintes.

## 5.2.8 - Cálculos:

## 5.2.8.1 - Coeficiente de proporcionalidade do ácido tioglicólico:

É calculado em relação ao octanoato de metilo a partir da mistura padrão.

Seja:

$t$  = o ácido tioglicólico;

$k_t$  = o seu coeficiente de proporcionalidade;

$m'_t$  = a sua massa (em miligramas) na mistura;

$S'_t$  = a área do seu pico;  
 $C$  = o caprilato de metilo;  
 $m'_c$  = a sua massa (em miligramas) na mistura;  
 $S'_c$  = a área do seu pico;

$$K_t = \frac{m'_t \cdot S'_c}{m'_c \cdot S'_t}$$

Este coeficiente é função da aparelhagem.

5.2.8.2 - Concentração do ácido tioglicólico na amostra:

Seja:

$t$  = o ácido tioglicólico;  
 $k_t$  = o seu coeficiente de proporcionalidade;  
 $S'_t$  = a área do seu pico;  
 $C$  = o caprilato de metilo;  
 $m'_c$  = a área do seu pico;  
 $M$  = a massa (em miligramas) de tomada de ensaio inicial.  
 A percentagem (m/m) de ácido tioglicólico na amostra é igual a:

$$\text{Percentagem (m/m) de ácido tioglicólico} = \frac{m_c \cdot k_t \cdot S'_t}{M \cdot S'_c} \cdot 100$$

6 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em ácido tioglicólico de 8% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos, efectuados sobre a mesma amostra, não deve ultrapassar 0,8%.

(nota \*) O doseamento do ácido tioglicólico deve fazer-se sobre os produtos ainda não utilizados e destapados recentemente, de modo a evitar oxidação.

## CAPÍTULO IV

### **Agentes de oxidação e peróxido de hidrogénio nos produtos capilares - Identificação e doseamento, respectivamente.**

Objectivo e campo de aplicação:

O doseamento iodométrico do peróxido de hidrogénio nos produtos cosméticos é possível na ausência de qualquer outro agente de oxidação que reaja com iodetos para tomar o iodo. Antes de iniciar o doseamento iodométrico do peróxido de hidrogénio, é, pois, indispensável detectar e identificar outros agentes de oxidação eventualmente presentes. Esta identificação efectua-se em duas operações, a primeira dizendo respeito aos persulfatos, bromatos e peróxido de hidrogénio e a segunda ao peróxido de bário.

#### **A - Identificação de persulfatos, bromatos e peróxido de hidrogénio**

1 - Princípio:

Os persulfatos de sódio, de potássio e de amónio, o bromato de potássio e de sódio e o peróxido de hidrogénio, quer seja ou não proveniente do peróxido de bário, são identificados por cromatografia descendente em papel, com a ajuda de dois eluentes.

## 2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

2.1 - Soluções aquosas de referência a 0,5% (m/v) dos compostos seguintes:

2.1.1 - Persulfato de sódio.

2.1.2 - Persulfato de potássio.

2.1.3 - Persulfato de amónio.

2.1.4 - Bromato de potássio.

2.1.5 - Bromato de sódio.

2.1.6 - Peróxido de hidrogénio.

2.2 - Eluente A: etanol a 80% (v/v).

2.3 - Eluente B: benzeno, metanol, álcool isoamílico, água (34:38:18:10, em volume).

2.4 - Reagente A: solução aquosa de iodeto de potássio a 10% (m/v).

2.5 - Reagente B: solução aquosa de amido a 1% (m/v).

2.6 - Reagente C: ácido clorídrico a 10% (m/m).

2.7 - Ácido clorídrico 4 N.

## 3 - Aparelhagem:

3.1 - Papel para cromatografia (Whatman n.os 3 e 4, ou equivalente).

3.2 - Micropipeta de 1 µl.

3.3 - Balões aferidos de 100 ml.

3.4 - Filtros de pregas.

3.5 - Material corrente para cromatografia descendente em papel.

## 4 - Preparação da amostra:

4.1 - Produtos solúveis na água:

Preparar duas soluções de amostra, dissolvendo, respectivamente, 1 g e 5 g do produto em 100 ml de água.

Para efectuar a cromatografia sobre papel descrita no n.º 5, utilizar 1 µl de cada uma destas duas soluções.

4.2 - Produtos parcialmente solúveis na água:

4.2.1 - Pesar 1 g a 5 g de amostra, suspender em 50 ml de água, completar a 100 ml e misturar. Filtrar as duas suspensões por um filtro de pregas (3.4) e utilizar 1 µl de cada um dos dois filtrados para efectuar a cromatografia em papel descrita no n.º 5.

4.2.2 - Preparar duas novas suspensões de 1 g a 5 g de amostra em 50 ml de água, acidificar com ácido clorídrico diluído (2.7), completar a 100 ml com água e misturar. Filtrar as suspensões por um filtro de pregas (3.4) e utilizar 1 µl de cada um dos dois filtrados para efectuar a cromatografia em papel descrita no n.º 5.

4.3 - Cremes:

Homogeneizar separadamente 5 g e 20 g do produto com 100 ml de água e utilizar as dispersões para efectuar a cromatografia em papel descrita no n.º 5.

## 5 - Técnica:

5.1 - Em duas tinas para cromatografia descendente em papel, colocar uma certa quantidade de eluentes A (2.2) e B (2.3). Saturar as tinas com vapores dos eluentes durante vinte e quatro horas, pelo menos.

5.2 - Numa tira de papel para cromatografia (Whatman n.º 3, ou equivalente) de 40 cm de comprimento e 20 cm de largura (3.1), ou de outro formato adequado, colocar em cada ponto de partida 1 (ml) de uma das soluções ou suspensões filtradas de amostra e de produto de referência preparadas de acordo com os n.os 4 e 2.1 e evaporar o solvente ao ar.

5.3 - Colocar a tira (5.2) na tina cheia de eluente A (5.1) e cromatografar até que este tenha percorrido 35 cm (cerca de quinze horas).

5.4 - Repetir as operações descritas nos n.os 5.2 e 5.3 com papel para cromatografia (Whatman n.º 4, ou equivalente) (3.1) e o eluente B (2.3). Cromatografar até que este tenha percorrido 35 cm (cerca de cinco horas).

5.5 - Após desenvolvimento, tirar as tiras de papel das tinas e secá-las ao ar.

5.6 - Revelar as manchas pulverizando:

5.6.1 - O reagente A (2.4) e logo a seguir o reagente B (2.5). As manchas de persulfatos aparecem em primeiro lugar no cromatograma, seguidas de manchas de peróxido de hidrogénio. Marcar estas manchas com um lápis.

5.6.2 - O reagente C (2.6) sobre cromatogramas obtidos no n.º 5.6.1. Aparecem manchas cinzentas-azuladas, que indicam a presença de bromatos.

5.7 - Nas condições indicadas para os eluentes A (2.2) e B (2.3), os valores Rf das soluções de referência (2.1) são os seguintes:

	Solvente A (2.2)	Solvente B (2.3)
Persulfato de sódio	0,40	0,10
Persulfato de potássio	0,40	0,02+0,05
Persulfato de amónio	0,50	0,10+0,20
Bromato de sódio	0,40	0,20
Bromato de potássio	0,40	0,10+0,20
Peróxido de hidrogénio	0,80	0,80

## B - Identificação do peróxido de bário

1 - Princípio:

A presença de peróxido de bário é posta em evidência:

Por um lado, pela formação de peróxido de hidrogénio após acidificação da amostra (título A, n.º 4.2);

Por outro, pela identificação dos iões bário.

Na ausência de persulfatos (título A), junta-se ácido sulfúrico diluído a uma parte da solução amostra ácida (4.1), o que desencadeia a formação de precipitado branco do sulfato de bário. A presença de iões bário na solução amostra (4.1) é confirmada por cromatografia em papel como se indica no n.º 5. No caso de presença simultânea de persulfato e de peróxido de bário (título B, n.º 4.2) depois da fusão alcalina do insolúvel e dissolução em ácido clorídrico, detecta-se a presença do ião bário por cromatografia e ou por precipitação sob a forma de sulfato.

2 - Reagentes:

2.1 - Metanol.

2.2 - Ácido clorídrico concentrado a 36% (m/m).

2.3 - Ácido clorídrico 6 N.

2.4 - Ácido sulfúrico 4 N.

- 2.5 - Rodizonato dissódico.
- 2.6 - Cloreto de bário ( $\text{Ba Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ ).
- 2.7 - Carbonato de sódio anidro.
- 2.8 - Solução aquosa de cloreto de bário a 1% (m/v).
- 2.9 - Eluente: metanol, ácido clorídrico concentrado a 36%, água (80:10:10, em volume).
- 2.10 - Reagente, solução aquosa de rodizonato dissódico a 0,1% (m/v); preparar a solução imediatamente antes da utilização.

### 3 - Aparelhagem:

- 3.1 - Micropipeta de 5 µl.
- 3.2 - Cadinhos de platina.
- 3.3 - Balões aferidos de 100 ml.
- 3.4 - Papel para cromatografia (Schleicher et Schull 2043 b, ou equivalente). Colocar durante uma noite na tina para cromatografia (título A, n.º 3.5) contendo o eluente (título B, n.º 2.9) e secar.
- 3.5 - Filtros de pregas.
- 3.6 - Material corrente para a cromatografia ascendente em papel.

### 4 - Preparação da amostra:

- 4.1 - Produtos que não contenham persulfatos:
  - 4.1.1 - Homogeneizar ou dissolver 2 g do produto em 50 ml de água e, por meio de ácido clorídrico (2.3), levar o pH da solução a 1, aproximadamente.
  - 4.1.2 - Transferir a solução ou suspensão para balão aferido de 100 ml. Completar o volume com água e misturar. Utilizar esta solução para efectuar a cromatografia em papel descrita no n.º 5 e para identificar o bário por precipitação do sulfato.
- 4.2 - Produtos que contenham persulfatos:
  - 4.2.1 - Homogeneizar ou dissolver 2 g do produto em 100 ml de água e filtrar.
  - 4.2.2 - Adicionar ao resíduo seco 7 a 10 vezes o seu peso de carbonato de sódio (título B, n.º 2.7), misturar e fundir a mistura num cadinho de platina (título B, 3.2) durante cerca de meia hora.
  - 4.2.3 - Arrefecer à temperatura ambiente, colocar o produto da fusão em suspensão em 50 ml de água e filtrar (título B, n.º 3.5).
  - 4.2.4 - Dissolver no ácido clorídrico 6 N (título B, n.º 2.3) e completar a 100 ml com água. Utilizar esta solução para efectuar a cromatografia em papel descrita no n.º 5 e para identificar o bário por precipitação do sulfato.

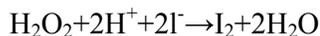
### 5 - Técnica:

- 5.1 - Numa tina para cromatografia ascendente em papel colocar uma certa quantidade de eluente (2.9) e saturar a tina durante quinze horas, pelo menos.
- 5.2 - Numa folha de papel para cromatografia, anteriormente tratada como indicado (3.4), aplicar, respectivamente, em três pontos, 5 µl de cada uma das soluções preparadas (4.1.2 e 4.2.4) e da solução de referência (2.8).
- 5.3 - Evaporar o solvente ao ar e cromatografar na vertical até que o eluente tenha percorrido 30 cm.
- 5.4 - Tirar o papel da tina e secá-lo ao ar.
- 5.5 - Revelar as manchas no cromatograma pulverizando com reagente (2.10).  
Em presença do bário, aparecem manchas vermelhas com Rf 0,10, aproximadamente.

## C - Doseamento do peróxido de hidrogénio

### 1 - Princípio:

O doseamento iodométrico do peróxido de hidrogénio baseia-se na reacção seguinte:



Trata-se de uma reacção lenta, mas é possível acelerá-la, adicionando molibdato de amónio. O iodo formado, doseado por processos titrimétricos com uma solução de tiosulfato de sódio, permite calcular o teor em peróxido de hidrogénio.

### 2 - Definição:

O teor da amostra em peróxido de hidrogénio determinado segundo este método é expresso em percentagem do produto (m/m).

### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Ácido sulfúrico 2 N.

3.2 - Iodeto de potássio.

3.3 - Molibdato de amónio.

3.4 - Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N.

3.5 - Solução de iodeto de potássio a 10% (m/v). Preparar a solução extemporaneamente.

3.6 - Solução de molibdato de amónio a 20% (m/v).

3.7 - Solução de amido a 1% (m/v).

### 4 - Aparelhagem:

4.1 - Copos de vidro de 100 ml.

4.2 - Bureta de 50 ml.

4.3 - Balão aferido de 250 ml.

4.4 - Provetas graduadas de 25 ml e 100 ml.

4.5 - Pipetas aferidas de 10 ml.

4.6 - Matrases de 250 ml.

### 5 - Técnica:

5.1 - Num copo de 100 ml pesar uma quantidade (em gramas) do produto equivalente a 0,6 g, aproximadamente, de peróxido de hidrogénio; transferir quantitativamente para um balão aferido de 250 ml com a ajuda de uma pequena quantidade de água, completar o volume com água e misturar.

5.2 - Pipetar 10 ml da solução da amostra (5.1) para um balão de 250 ml (4.6) e adicionar sucessivamente 100 ml de ácido sulfúrico 2 N (3.1), 20 ml de solução de iodeto de potássio (3.5) e três gotas de solução de molibdato de amónio (3.6).

5.3 - Titular imediatamente o iodo formado com a solução de tiosulfato de sódio 0,1 N (3.4) e, na proximidade do ponto de equivalência, juntar alguns mililitros de solução de amido como indicador. Anotar a quantidade, em mililitros, de tiosulfato de sódio 0,1 N utilizada (V).

5.4 - Conforme o processo indicado nos n.ºs 5.1 e 5.3, efectuar um ensaio em branco, substituindo os 10 ml da solução da amostra por 10 ml de água. Anotar a quantidade em mililitros de tiosulfato de sódio 0,1 N utilizada (V<sub>0</sub>).

**6 - Cálculo:**

Calcular o teor do produto em peróxido de hidrogénio, em percentagem de massa (m/m), pela fórmula:

$$\text{percentagem de peróxido de hidrogénio} = \frac{(V - V_o) \cdot 1,7008 \cdot 250}{m \cdot 10 \cdot 1000}$$

$$\text{percentagem de peróxido de hidrogénio} = \frac{(V - V_o) \cdot 4,252}{m}$$

em que:

$m$  = a quantidade, em gramas, de produto examinado (5.1);

$V_o$  = a quantidade, em mililitros, de solução de tiosulfato 0,1 N consumida no doseamento do ensaio em branco (5.4);

$V$  = a quantidade, em mililitros, de solução de tiosulfato 0,1 N consumida no doseamento da solução de amostra (5.3).

**7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):**

Para um teor de peróxido de hidrogénio da ordem dos 6% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,2%.

## CAPÍTULO V

### Amoníaco - Doseamento

**1 - Objectivo e campo de aplicação:**

O método descreve o doseamento do amoníaco livre no conjunto dos produtos cosméticos.

**2 - Definição:**

O teor da amostra em amoníaco determinado segundo este método é expresso em percentagem de  $\text{NH}_3$  (m/m).

**3 - Princípio:**

Uma solução de cloreto de bário é adicionada ao produto cosmético em meio metanol-água. O precipitado eventualmente formado é filtrado ou centrifugado. Este modo de proceder evita, no decurso da destilação em corrente de vapor, o arrastamento de certos sais de amónio, tais como o carbonato, o hidrogenocarbonato, os sais de ácidos gordos, etc., com excepção do acetato de amónio. O amoníaco é arrastado pelo vapor a partir do filtrado ou da parte sobrenadante e doseado por titrimetria de retorno com indicador, ou titrimetria potenciométrica directa.

**4 - Reagentes:**

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

**4.1 - Metanol.****4.2 - Solução de cloreto de bário di-hidratado a 25% (m/v).****4.3 - Solução de ácido ortobórico a 4% (m/v).**

- 4.4 - Solução aferida de ácido sulfúrico 0,5 N.
- 4.5 - Antiespuma líquido.
- 4.6 - Solução aferida de hidróxido de sódio 0,5 N.
- 4.7 - Indicador: misturar 5 ml de uma solução de vermelho de metilo a 0,1% em etanol e 2 ml de uma solução de azul de metileno a 0,1% em água.

5 - Aparelhagem:

- 5.1 - Material corrente de laboratório.
- 5.2 - Centrífuga com tubos fechados.
- 5.3 - Aparelho de arrastamento pelo vapor.
- 5.4 - Potenciómetro.
- 5.5 - Eléctrodo de vidro e eléctrodo de referência de dicloreto de dimercúrio (calomelanos).

6 - Técnica:

- 6.1 - Num balão aferido de 100 ml pesar, com aproximação de 1 mg, uma quantidade da amostra (m), correspondente, no máximo, a 150 mg de  $NH_3$ .
- 6.2 - Adicionar:

Água: 10 ml;  
Metanol (4.1): 10 ml;  
Solução de cloreto de bário (4.2): 10 ml.

Completar o volume com metanol (4.1).

- 6.3 - Homogeneizar e deixar uma noite no frigorífico (5°C).
- 6.4 - A solução, ainda fria, é filtrada ou centrifugada em tubos fechados, durante dez minutos, de modo a obter um líquido sobrenadante límpido.
- 6.5 - Introduzir, medindo por pipeta, 40 ml da solução límpida no aparelho de arrastamento (5.3) e, eventualmente, 0,5 ml de antiespuma (4.5).
- 6.6 - Destilar e recolher 200 ml de produto destilado num copo de 250 ml contendo 10,0 ml de ácido sulfúrico 0,5 N (4.4) e 0,1 ml do indicador (4.7).
- 6.7 - Dosear por retorno o ácido sulfúrico em excesso com a solução de hidróxido de sódio (4.6).
- 6.8 - No caso de um doseamento potenciométrico, recolher 200 ml de produto destilado num copo de 250 ml contendo 25 ml da solução de ácido ortobórico (4.3) e titular com ácido sulfúrico 0,5 N (4.4).

7 - Expressão dos resultados:

- 7.1 - Doseamento por retorno com o indicador.

Seja:

$V_1$ (ml) = o volume da solução de hidróxido de sódio 0,5 N (4.6) utilizado;  
 $T_1$  = o título exacto da solução de hidróxido de sódio 0,5 N (4.6);  
 $T_2$  = o título exacto da solução de ácido sulfúrico 0,5 N (4.4);  
 $m$ (mg) = massa da amostra (6.1).

$$\text{Percentagem (m/m) } NH_3 = \frac{(10 T_2 - V_1 T_1) \cdot 17 \cdot 100}{0,4 m} = \frac{(10 T_2 - V_1 T_1) \cdot 4250}{m}$$

7.2 - Doseamento potenciométrico directo, em que:

$V_2$ (ml) = o volume da solução de ácido sulfúrico 0,5 N (4.4) utilizado;

$T_2$  = o título exacto da solução de ácido sulfúrico 0,5 N (4.4);

$m$ (mg) = a massa da amostra (6.1).

$$\text{Porcentagem de (n/n) de } NH_3 = \frac{V_2 \cdot T_2 \cdot 17 \cdot 100}{0,4 m} = \frac{V_2 \cdot T_2 \cdot 4250}{m}$$

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para o teor em  $NH_3$  da ordem de 6%, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,6%.

## CAPÍTULO VI

### 1-(4-aminobenzoato) de glicerol Identificação e doseamento

#### A - Identificação

1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método destina-se a pôr em evidência o 1-(4-aminobenzoato) de glicerol ou 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo. Permite igualmente identificar o 4-aminobenzoato de etilo (benzocaína DCI) eventualmente presente como impureza.

2 - Princípio:

A identificação faz-se por cromatografia em camada fina de gele de sílica com indicador de fluorescência e caracterização da função amina primária livre por formação sobre a placa de um corante diazótico.

3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Mistura solvente: ciclo-hexano, isopropanol e diclorometano estabilizado (48:64:9, em volume).

3.2 - Eluente: éter de petróleo, benzeno, acetona e amónia (mínimo 25%  $NH_3$ ): (35:35:35:1, em volume).

3.3 - Revelador:

Solução a): nitrito de sódio: 1,0 g em 100 ml de HCl 1 M, a preparar extemporaneamente;

Solução b): 2-naftol: 0,2 g em 100 ml de KOH 1 M.

3.4 - Soluções padrão:

4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo: 0,050 g em 100 ml da mistura solvente (3.1);

4-aminobenzoato de etilo: 0,050 g em 100 ml da mistura solvente (3.1).

3.5 - Placa de gele de sílica 60 F<sub>254</sub>, com espessura de 0,25 mm e formato de 20 cm x 20 cm.

#### 4 - Aparelhagem:

- 4.1 - Equipamento corrente de cromatografia em camada fina.
- 4.2 - Aparelho vibrador de ultra-sons.
- 4.3 - Filtro Millipore FH 0,5 µm, ou equivalente.

#### 5 - Técnica:

##### 5.1 - Preparação da amostra:

Pesar 1,5 g da amostra num balão aferido de rolha esmerilhada de 10 ml. Completar a 10 ml com a mistura solvente (3.1). Tapar e deixar durante uma hora à temperatura ambiente num aparelho vibrador de ultra-sons (4.2). Filtrar por um filtro Millipore (4.3). Utilizar o filtrado para a cromatografia.

##### 5.2 - Cromatografia em camada fina:

Aplicar sobre a placa (3.5) 10 µl do filtrado (5.1) e 10 µl de cada solução padrão (3.4). Desenvolver o cromatograma no percurso de 15 cm numa tina previamente saturada com o solvente (3.2). Deixar secar à temperatura ambiente.

##### 5.3 - Revelação:

5.3.1 - Observar a placa a luz ultravioleta a 254 nm.

5.3.2 - Sobre a placa perfeitamente seca, vaporizar com a solução 3.3, a). Deixar à temperatura ambiente durante um minuto e vaporizar imediatamente com a solução 3.3, b). Secar a placa na estufa a 60°C. As manchas aparecem coradas de alaranjado, com os valores de Rf seguintes: 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo: 0,07; 4-aminobenzoato de etilo: 0,55.

## B - Doseamento

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento do 1-(4-aminobenzoato) de glicerol (4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo). Permite igualmente o dosamento do 4-aminobenzoato de etilo. É o adequado para dosear, no máximo, 5% (m/m) de 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo e 1% (m/m) de 4-aminobenzoato de etilo.

#### 2 - Definição:

O teor em 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo e em 4-aminobenzoato de etilo avaliado por este método e expresso em percentagem de massa [% (m/m)] do produto.

#### 3 - Princípio:

O produto a analisar é posto em suspensão em metanol e, após tratamento adequado, o doseamento é efectuado por cromatografia líquida a alta pressão (HPLC).

#### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica e, nomeadamente, ser próprios para a cromatografia líquida a alta pressão.

4.1 - Metanol.

4.2 - Di-hidrogeno-ortofosfato de potássio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

4.3 - Acetato de zinco (II)  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .

4.4 - Ácido acético: ( $d_4^{20} = 1,05$ )

4.5 - Ferrocianeto de tetrapotássio:  $\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ .

4.6 - 4-hidroxibenzoato de etilo.

4.7 - 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo.

4.8 - 4-aminobenzoato de etilo (benzocaína).

4.9 - Solução tampão (0,02 M): dissolver 2,72 g de di-hidrogeno-ortofosfato de potássio (4.2) em 1 l de água.

4.10 - Eluente: solução tampão (4.9) e metanol (4.1) (61:39, em volume). A composição desta fase móvel pode ser modificada de tal modo que o factor de resolução R seja igual ou superior a 1,5:

$$R = 2 \cdot \frac{d' R_2 - d' R_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$R_1$  e  $R_2$  = tempo de retenção, expresso em minutos, de dois picos;

$W_1$  e  $W_2$  = largura, expressa em milímetros, dos mesmos picos a meia altura;

$d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

4.11 - Solução mãe de 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo: pesar com precisão cerca de 40 mg de 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo. Introduzi-los num balão aferido de 100 ml. Dissolver em 40 ml de metanol (4.1). Completar o volume com a solução tampão (4.9) e misturar.

4.12 - Solução mãe de 4-aminobenzoato de etilo: pesar com precisão cerca de 40 mg de 4-aminobenzoato de etilo. Introduzi-los num balão aferido de 100 ml. Dissolver em 40 ml de metanol (4.1). Completar o volume com a solução tampão (4.9) e misturar.

4.13 - Solução do padrão interno: pesar com precisão cerca de 50 mg de 4-hidroxibenzoato de etilo (4.6) e dissolvê-los em 40 ml de metanol (4.1). Introduzir a solução num balão aferido de 100 ml, completar o volume com a solução tampão (4.9) e misturar.

4.14 - Soluções padrão: por dissolução em 100 ml de eluente (4.10), preparar quatro soluções padrão conforme o quadro seguinte:

Solução padrão	4-aminobenzoato de $\alpha$ -monoglicerilo		4-aminobenzoato de etilo		4-hidroxibenzoato de etilo	
	ml (4.11)	$\mu\text{g/ml}^{(*)}$	ml (4.12)	$\mu\text{g/ml}^{(*)}$	ml (4.13)	$\mu\text{g/ml}^{(*)}$
I.....	2	8	2	8	10	50
II.....	4	16	3	12	10	50
III.....	6	24	4	16	10	50
IV.....	10	40	5	20	10	50

(\*) Estes valores são dados a título indicativo e correspondem a uma pesagem exacta das soluções 4.11, 4.12 e 4.13

4.15 - Solução de Carrez I: dissolver 26,5 g de ferrocianeto tetrapotássico (4.5) em água e completar o volume a 250 ml.

4.16 - Solução de Carrez II: dissolver 54,9 g de acetato de zinco (II) (4.3) e 7,5 ml de ácido acético (4.4) em água e completar a 250 ml.

4.17 - Lichrosorb RP-18, ou equivalente, de 5  $\mu\text{m}$ .

Nota. - Estas soluções podem ser obtidas de modo diferente.

5 - Aparelhagem:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Cromatógrafo em fase líquida, a alta pressão, com detector no ultravioleta, com comprimento de onda variável e câmara termostada a 45°C.

5.3 - Coluna em ácido inoxidável: comprimento, 250 mm, diâmetro interior, 4,6 mm. A coluna é cheia com Lichrosorb RP-18 (4.17).

#### 5.4 - Banho de ultra-sons.

#### 6 - Técnica:

##### 6.1 - Preparação da amostra:

6.1.1 - Pesar com precisão cerca de 1 g de amostra num copo de 100 ml e juntar 10 ml de metanol (4.1).

6.1.2 - Colocar o copo durante vinte minutos num banho de ultra-sons (5.4). Transferir quantitativamente a suspensão assim obtida para um balão aferido de 100 ml com 75 ml de eluente (4.10), no máximo. Juntar sucessivamente 1 ml de solução de Carrez I (4.15) e 1 ml de solução de Carrez II (4.16), misturando após cada operação. Completar o volume com eluente (4.10), misturar de novo e filtrar por filtro de pregas.

6.1.3 - Com uma pipeta introduzir, num balão aferido de 50 ml, 3,0 ml do filtrado obtido no n.º 6.1.2 e 5,0 ml da solução do padrão interno (4.13). Completar o volume com eluente (4.10) e misturar. Utilizar a solução assim obtida para proceder à análise cromatográfica descrita no n.º 6.2.

##### 6.2 - Cromatografia:

6.2.1 - Regular o débito da fase móvel (4.10) para 1,2 ml/min. e fixar a temperatura da coluna em 45°C.

6.2.2 - Regular o detector (5.2) em 274 nm.

6.2.3 - Por meio de uma microseringa, fazer pelo menos duas injeções de 20 µl da solução 6.1.3 e medir a área dos picos.

##### 6.3 - Curvas de calibração:

6.3.1 - Injectar 20 µl de cada uma das soluções padrão (4.14) e medir a área dos picos.

6.3.2 - Para cada concentração, calcular a relação entre a área do pico de 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo e a área do pico do padrão interno. Traçar a curva de calibração colocando esta relação em ordenada e a relação das massas correspondentes em abcissa.

6.3.3 - Proceder do mesmo modo para o 4-aminobenzoato de etilo.

#### 7 - Cálculo:

7.1 - Sobre as curvas da calibração obtidas no n.º 6.3, ler as relações de massa  $RP_1$  e  $RP_2$  correspondentes às relações entre as áreas dos picos calculados no n.º 6.2.3, em que:

$RP_1$  = relação das massas de 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo e 4-hidroxibenzoato de etilo;

$RP_2$  = relação das massas de 4-aminobenzoato de etilo e 4-hidroxibenzoato de etilo.

7.2 - A partir das relações de massa assim obtidas, calcular o teor em 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo e em 4-aminobenzoato de etilo, em percentagem de massa (m/m), por meio das fórmulas:

$$\text{Percentagem (m/m) de 4-aminobenzoato de } \alpha\text{-monoglicerilo} = RP_1 \cdot \frac{q}{6p}$$

$$\text{Percentagem (m/m) de 4-aminobenzoato de etilo} = RP_2 \cdot \frac{q}{6p}$$

$q$  = quantidade, em miligramas, de 4-aminobenzoato de etilo (padrão interno) pesada no n.º 4.13.

$p$  = quantidade, em gramas, da amostra pesada no n.º 6.1.1.

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

8.1 - Para um teor de 5% (m/m) em 4-aminobenzoato de  $\alpha$ -monoglicerilo, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,25%.

8.2 - Para um teor de 1% (m/m) de 4-aminobenzoato de etilo, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,10%.

9 - Notas:

9.1 - Antes de efectuar a análise propriamente dita, é conveniente determinar se a amostra não contém um composto susceptível de coincidir com o pico do padrão interno (4-aminobenzoato de etilo) sobre o cromatograma.

9.2 - Para verificar a ausência de eventuais interferências, repetir o doseamento, modificando em mais ou menos 10% a proporção de metanol na fase móvel.

## CAPÍTULO VII

### Cloratos de metais alcalinos - Identificação e doseamento

Objectivo e campo de aplicação:

O método descreve a identificação e o doseamento dos cloratos nos dentífricos e outros produtos cosméticos.

#### A - Identificação

1 - Princípio:

Os cloratos são separados dos outros halogenatos por cromatografia em camada fina e detectados por formação de iodo obtido por oxidação do iodeto de potássio.

2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

2.1 - Solução de referência: soluções aquosas de clorato, bromato e iodato de potássio (0,2% m/v) preparadas recentemente.

2.2 - Eluente: solução de amoníaco (28% m/v), acetona e butanol (60:130:30, em volume).

2.3 - Solução aquosa de iodeto de potássio (5% m/v).

2.4 - Solução de amido (1% a 5% m/v).

2.5 - Ácido clorídrico 1 M.

2.6 - Placas de cromatografia em camada fina pré-preparadas revestidas de celulose (espessura: 0,25 mm).

3 - Aparelhagem:

Material corrente de laboratório para cromatografia em camada fina.

4 - Técnica:

4.1 - Extrair cerca de 1 g da amostra com água, filtrar e diluir até cerca de 25 ml.

4.2 - Aplicar sobre a placa (2.6) 2 µl da solução 4.1 e 2 µl de cada uma das três soluções de referência (2.1).

4.3 - Introduzir a placa numa tina e desenvolver por cromatografia ascendente no percurso de cerca de três quartos do comprimento da placa com a ajuda do eluente (2.2).

4.4 - Retirar a placa da tina e deixar evaporar o eluente (duas horas, aproximadamente).

4.5 - Pulverizar a placa com a solução de iodeto de potássio (2.3) e deixar secar durante cerca de cinco minutos.

4.6 - Pulverizar a placa com a solução de amido (2.4) e deixar secar durante cerca de cinco minutos.

4.7 - Pulverizar a placa com ácido clorídrico (2.5).

5 - Avaliação:

Em presença de clorato, aparece uma mancha azul (eventualmente castanha) passada meia hora.

**Os valores de Rf são os seguintes:**

	Rf
Iodato.....	0 — 0,2
Bromato.....	0,5 — 0,6
Clorato.....	0,7 — 0,8

Como os bromatos e os iodatos produzem reacções imediatas, procurar-se-á não confundir as manchas de bromato e de clorato.

## B - Doseamento

1 - Definição:

O teor da amostra em clorato determinado por este método é expresso em percentagem de massa de clorato.

2 - Princípio:

O clorato é reduzido por zinco em pó em meio ácido. O cloreto formado é titulado potenciométricamente pelo nitrato de prata. Um doseamento análogo antes da redução permite revelar a presença eventual de halogenetos.

3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Ácido acético a 80% (m/m).

3.2 - Zinco em pó.

3.3 - Solução titulada de nitrato de prata 0,1 M.

4 - Aparelhagem:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Potenciómetro equipado com um eléctrodo indicador de prata.

5 - Técnica:

### 5.1 - Preparação da amostra:

Pesar com precisão uma quantidade (*m*) de cerca de 2 g num tubo de centrífuga. Juntar cerca de 15 ml de ácido acético (3.1) e misturar cuidadosamente. Esperar trinta minutos e centrifugar durante quinze minutos a 2000 rpm. Transferir a solução sobrenadante para um balão aferido de 50 ml. Repetir duas vezes a centrifugação, juntando 15 ml de ácido acético (3.1) ao resíduo. Recolher as soluções que contêm o clorato no mesmo balão aferido.

Completar o volume com ácido acético (3.1).

### 5.2 - Redução do clorato:

A 20 ml da solução 5.1 juntar 0,6 g de zinco em pó (3.2). Aquecer à ebulição num balão munido de um refrigerante de refluxo. Após trinta minutos de ebulição, deixar arrefecer e filtrar. Lavar o balão com água, filtrar e reunir o filtrado e as águas de lavagem.

### 5.3 - Doseamento de clorto:

Titular a solução 5.2 com nitrato de prata (3.3) por meio de potenciómetro (4.2). Titular do mesmo modo 20 ml de solução 5.1 com nitrato de prata (3.3).

Se o produto contiver derivados de bromo ou de iodo susceptíveis de libertar brometos de iodeto após redução, a curva de titulação apresenta vários pontos de inflexão. Neste caso, o volume da solução titulada (3.3) correspondente ao cloreto é representado pela diferença entre os volumes correspondentes aos último e antepenúltimo pontos de inflexão.

### 6 - Cálculo:

O teor em clorato da amostra é calculado segundo a fórmula:

$$\text{Porcentagem (m/m) de clorato} = \frac{20,9(V - V')M}{m}$$

em que:

*V* = volume, em milímetros, da solução de nitrato de prata (3.3) utilizada para a titulação a solução 5.2;

*V'* = volume, em milímetros, da solução de nitrato de prata (3.3) utilizada para a titulação da solução 5.1;

*M* = molaridade da solução de nitrato de prata (3.3);

*m* = massa, em gramas, da amostra 5.1.

### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em clorato de 3% a 5% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,07% (m/m).

## CAPÍTULO VIII

### Clorobutanol - Doseamento

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

O presente método é o adequado para o doseamento do clorobutanol na concentração máxima 0,5% (m/m) para todos os produtos cosméticos, com excepção dos aerossóis.

## 2 - Definição:

O teor em clorobutanol avaliado por este método é expresso em percentagem de massa (m/m) do produto.

## 3 - Princípio:

Após tratamento adequado do produto a analisar, o doseamento é efectuado por cromatografia em fase gasosa, utilizando o 2,2,2-tricloroetanol como padrão interno.

## 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Clorobutanol (1,1,1-tricloro-2-metilpropanol-2).

4.2 - 2,2,2-tricloroetanol.

4.3 - Etanol absoluto.

4.4 - Solução padrão de clorobutanol: 0,025 g em 100 ml de etanol (4.3) (m/v).

4.5 - Solução padrão de 2,2,2-tricloroetanol: 0,004 g em 100 ml de etanol (4.3) (m/v).

## 5 - Aparelhagem:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Cromatógrafo em fase gasosa com detector de captura de electrões 63 Ni.

## 6 - Técnica:

6.1 - Preparação da amostra:

Pesar com precisão de 0,1 g a 0,3 g de amostra. Introduzi-la num balão aferido de 100 ml, dissolver em etanol (4.3), juntar 1 ml da solução do padrão interno (4.5) e completar o volume com etanol (4.3).

6.2 - Condições da cromatografia em fase gasosa:

6.2.1 - As condições do ensaio devem ser de modo que o factor de resolução R da coluna seja igual ou superior a 1,5:

$$R = 2 \cdot \frac{d'R_2 - d'R_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$R_1$  e  $R_2$  = tempo de retenção, expresso em minutos, de dois picos consecutivos;

$W_1$  e  $W_2$  = largura dos picos a meia altura, expressa em milímetros;

$d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

6.2.2 - A título de exemplo, as seguintes condições do ensaio permitem o resultado procurado:

Coluna	I	II
Natureza.....	Vidro.....	Aço inoxidável.
Comprimento.....	1,80 m.....	3 m
Diâmetro.....	3 mm.....	3 mm.
Enchimento.....	10% carbowax 20 MTPA Gaschrom Q 80-100 mesh.	5% OV 17 sobre Chromosorb WAW DMCS 80-100 mesh
Acondicionamento.....	Dois a três dias a 190°C.	—
Temperaturas:		

Injectar.....	200°C.....	150°C.
Coluna.....	150°C.....	100°C.
Detector.....	200°C.....	150°C.
Gás de arrastamento.....	Azoto.....	Argon/metano (95/5,v/v).
Débito.....	35 ml/min.....	32 ml/min.

### 6.3 - Curva de calibração:

Em cinco balões aferidos de 100 ml, juntar a 1 ml da solução do padrão interno (4.5) respectivamente 0,20 ml, 0,30 ml, 0,40 ml, 0,50 ml e 0,60 ml da solução 4.4 e completar a 100 ml com etanol (4.3). Injectar 1 µl de cada uma destas soluções no cromatógrafo, segundo a técnica descrita no n.º 6.2.2, e traçar a curva de calibração, indicando em abcissa a relação das massa do clorobutanol e do 2,2,2-tricloroetanol e em ordenada a relação das áreas correspondentes.

6.4 - Injectar 1 µl da solução obtida no n.º 6.1 e proceder conforme descrito no n.º 6.2.2.

### 7 - Cálculo:

7.1 - Calcular a partir da curva de calibração (6.3) a quantidade (a) expressa em microgramas de clorobutanol da solução 6.1.

7.2 - O teor em clorobutanol da amostra em percentagem de massa (m/m) é calculado segundo a fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de clorobutanol} = \frac{a \cdot 10^2}{p \cdot 10^6} = \frac{a}{p \cdot 10^4}$$

### 8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em clorobutanol de 0,5% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,01%.

Nota. - Se o resultado for igual ou superior à concentração máxima autorizada, é conveniente verificar a ausência de interferências.

## CAPÍTULO IX

### Clorofórmio nas pastas dentífricas - Doseamento

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento, por cromatografia em fase gasosa, de clorofórmio nas pastas dentífricas.

O limite de quantificação do método é de 5% de clorofórmio.

#### 2 - Definição:

O clorofórmio doseado segundo este método é expresso em percentagem de massa do produto.

#### 3 - Princípio:

Coloca-se a pasta dentífrica em suspensão numa mistura de dimetilformamida e de metanol e junta-se uma certa quantidade de acetonitrilo como padrão interno. Após centrifugação, examina-se uma parte da fase líquida por cromatografia em fase gasosa e calcula-se o teor em clorofórmio.

#### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Porapak Q, ou Chromosorb 101, ou equivalente (80-100 *mesh*).

4.2 - Acetonitrilo.

4.3 - Clorofórmio.

4.4 - Dimetilformamida.

4.5 - Metanol.

4.6 - Solução de padrão interno:

Pipetar 5 ml de dimetilformamida (4.4) num balão graduado de 50 ml e acrescentar cerca de 300 mg (M), exactamente pesados, de acetonitrilo. Completar até ao traço com a dimetilformamida e misturar.

4.7 - Solução para determinar o factor de resposta relativo:

Pipetar 5 ml de solução de padrão interno (4.6) num balão graduado de 10 ml e acrescentar cerca de 300 mg (M1) de clorofórmio (4.3) exactamente pesados. Completar até ao traço com dimetilformamida e misturar.

5 - Aparelhagem:

5.1 - Balança analítica.

5.2 - Cromatógrafo de fase gasosa, provido de um detector de ionização de chama.

5.3 - Seringa para injeção de 5 µl ou 10 µl, graduada a um décimo.

5.4 - Pipetas aferidas de 1,4 ml e 5 ml.

5.5 - Balões aferidos de 10 ml e 50 ml.

5.6 - Tubos de ensaio de cerca de 20 ml com tampa de rosca. O interior da tampa é provido de uma placa em matéria plástica com uma das faces revestida a teflon.

5.7 - Centrífuga.

6 - Modo operativo:

6.1 - Condições da cromatografia em fase gasosa:

6.1.1 - Tipo de coluna:

Vidro espiralado;

Comprimento: 150 cm;

Diâmetro interno: 4 mm;

Diâmetro externo: 6 mm.

6.1.2 - Enchimento: Porapak Q, ou Chromosorb 101, ou equivalente (80-100 *mesh*) (4.1).

6.1.3 - Detector: ionização de chama:

Regular a sua sensibilidade de modo que, após a injeção de 3 µl da solução 4.7, a altura do pico do acetonitrilo atinja cerca de três quartos da totalidade da escala.

6.1.4 - Gás vector: azoto; débito: 65 ml/min.:

Regular o débito dos gases ao nível do detector de ionização de chama, de modo que o débito do ar ou do oxigénio seja 5 a 10 vezes o do hidrogénio.

6.1.5 - Temperaturas:

Injector: 210°C;

Detector: 210°C;

Coluna: 175°C.

6.1.6 - Registador:

Velocidade do papel: cerca de 100 cm/h.

6.2 - Preparação da amostra:

Efectuar a tomada de ensaio a partir de um tubo ainda não aberto. Eliminar um terço do conteúdo, fechar de novo o tubo, misturar cuidadosamente no tubo e colher então a amostra para análise.

6.3 - Doseamento:

6.3.1 - Pesar, com uma precisão de 10 mg, 6 g ou 7 g ( $M_0$ ) de pasta dentífrica, tratada conforme o n.º

6.2, num tubo com tampa roscada (5.6) e juntar algumas pérolas de vidro.

6.3.2 - Com um pipeta deitar 5,0 ml da solução de padrão interno (4.6), 4 ml de dimetilformamida (4.4) e 1 ml de metanol (4.5) no tubo. Fechar a tampa e homogeneizar.

6.3.3 - Agitar durante meia hora com um agitador mecânico e centrifugar durante quinze minutos o tubo fechado, a uma tal velocidade que se obtenha uma separação nítida das fases.

Nota. - Acontece às vezes que a fase líquida é ainda turva após centrifugação. Neste caso acrescentar 1 g a 2 g de cloreto de sódio à fase líquida e centrifugar de novo.

6.3.4 - Injectar 3 µl desta solução (6.3.3.) nas condições descritas no n.º 6.1. Repetir esta operação.

Nas condições referidas, podemos dar como orientação os seguintes tempos de retenção:

Metanol: cerca de um minuto;

Acetonitrilo: cerca de dois minutos e meio;

Clorofórmio: cerca de seis minutos;

Dimetilformamida: > quinze minutos.

6.3.5 - Determinação do factor de resposta relativo:

Injectar 3 µl de solução 4.7 para determinar o factor de resposta relativo. Repetir esta operação e determinar diariamente o factor de resposta relativo.

7 - Cálculo:

7.1 - Cálculo da resposta relativa:

7.1.1 - Medir as alturas e a largura a meia altura dos picos de acetonitrilo e clorofórmio e calcular a área dos dois picos pela fórmula: altura x largura a meia altura.

7.1.2 - Determinar a área dos picos do acetonitrilo e do clorofórmio nos cromatogramas obtidos no n.º 6.3.5 e calcular a resposta relativa ( $f_s$ ) através da fórmula:

$$f_s = \frac{A_s \cdot M_i}{M_s \cdot A_i} = \frac{A_s \cdot 1/10M}{A_i \cdot M_i}$$

na qual:

$f_s$  = factor de resposta relativa para o clorofórmio;

$A_s$  = área do pico do clorofórmio (6.3.5);

$A_i$  = área do pico de acetonitrilo (6.3.5);

$M_s$  = quantidade de clorofórmio, em miligramas, por 10 ml da solução utilizada no n.º 6.3.5

( $M_i$ );

$M_i$  = quantidade de acetonitrilo, em miligramas, por 10 ml da solução utilizada no n.º 6.3.5 (=1/10 M).

Calcular a média dos valores encontrados.

7.2 - Cálculo do teor em clorofórmio:

7.2.1 - Calcular da maneira descrita no n.º 7.1.1 a área dos picos de clorofórmio e acetonitrilo dos cromatogramas obtidos no n.º 6.3.4.

7.2.2 - Calcular o teor em clorofórmio das pastas dentífricas pela fórmula:

$$\text{Porcentagem X} = \frac{A_s \cdot M_i}{f_s \cdot M_{sx} \cdot A_i} \cdot 100\% = \frac{A_i \cdot M}{f_s \cdot A_i \cdot M_o} \cdot 100$$

na qual:

Porcentagem X = teor em clorofórmio em percentagem de massa da pasta dentífrica;

$A_s$  = área do pico de clorofórmio (6.3.4);

$A_i$  = área do pico de acetonitrilo (6.3.4);

$M_{sx}$  = peso, em miligramas, da amostra examinada no n.º 6.3.1 (= 1000  $M_o$ );

$M_i$  = quantidade de acetonitrilo, em miligramas, para 10 ml da solução obtida no n.º 6.3.2(1/10 M).

Calcular a média dos teores obtidos e expressar o resultado com aproximação às décimas.

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em clorofórmio de 3% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados com a mesma amostra não deve ultrapassar 0,3%.

## CAPÍTULO X

### Compostos de flúor nas pastas dentífricas - Doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento do flúor total nas pastas dentífricas. É conveniente para teores que não excedam 0,25%.

2 - Definição:

O teor da amostra em flúor determinado segundo este método é expresso em percentagem de massa (m/m).

3 - Princípio:

O flúor do composto fluorado é transformado em trietilfluorsilano (TEFS) por reacção directa com trietilclorosilano (TECS) em meio ácido e, simultaneamente, extraído com a ajuda de xileno contendo ciclo-hexano como padrão interno. A solução obtida é analisada por cromatografia em fase gasosa.

4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Fluoreto de sódio seco a 120°C até massa constante.

4.2 - Água bidestilada ou de qualidade equivalente.

4.3 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,19$ )

4.4 - Ciclo-hexano (CH).

4.5 - Xileno que não dê origem a picos interferentes quando cromatografado nas mesmas condições que as da amostra 6.1. Em caso de necessidade, purificar por destilação (5.8).

4.6 - Trietilclorosilano (TECS Merck, ou equivalente).

4.7 - Soluções padrão de fluoreto.

4.7.1 - Solução padrão de 0,250 mg de fluoreto/ml:

Pesar exactamente 138,1 mg de fluoreto de sódio (4.1) e dissolvê-los em água (4.2). Transferir quantitativamente a solução para um balão aferido de 250 ml (5.5). Completar o volume com água (4.2) e misturar.

4.7.2 - Solução padrão diluída, 0,050 mg de fluoreto/ml. Transferir, com a ajuda de uma pipeta, 20 ml da solução 4.7.1 para um balão aferido de 100 ml (5.5). Completar o volume com água (4.2) e misturar.

4.8 - Solução padrão interno:

Misturar 1 ml de ciclo-hexano (4.4) e 5 ml de xileno (4.5).

4.9 - Solução padrão interno de trietilclorosilano:

Transferir, com a ajuda de uma pipeta (5.7), 0,6 ml de TECS (4.6) e 0,12 ml da solução padrão interno (4.8) para um balão aferido de 10 ml. Completar o volume com xileno (4.5) e misturar. Solução a preparar diariamente.

4.10 - Ácido perclórico a 70% (m/v).

4.11 - Ácido perclórico a 20% (m/v) em água (4.2).

5 - Aparelhagem:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Cromatógrafo de fase gasosa munido de um detector de ionização de chama.

5.3 - Homogeneizador Vortex, ou equivalente.

5.4 - Agitador Buhler, tipo SMB1, ou equivalente.

5.5 - Balões aferidos de 100 ml a 250 ml, em polipropileno.

5.6 - Tubos de centrífuga de 20 ml de vidro com tampas de rosca recobertas de teflon Sovirel tipo 611-56, ou equivalente. Limpar os tubos e as tampas da maneira seguinte: mergulhar durante várias horas em ácido perclórico (4.11), lavar cinco vezes com água (4.2) e secar a 100°C.

5.7 - Pipetas reguláveis susceptíveis de fornecer volumes de 50 µl a 200 µl, com extremidade plástica de utilização única.

5.8 - Aparelho de destilação munido de uma coluna Schneider de três bolas ou de uma coluna de Vigreux equivalente.

6 - Técnica:

6.1 - Análise da amostra:

6.1.1 - Escolher um tubo de pasta dentífrica que ainda não foi aberto. Abrir o tubo. Transferir todo o conteúdo para um recipiente de plástico, misturar cuidadosamente e conservar em condições que impeçam a deterioração.

6.1.2 - Pesar exactamente cerca de 150 mg (m) de amostra num tubo de centrífuga (5.6), juntar 5 ml de água (4.2) e homogeneizar (5.3).

6.1.3 - Juntar 1 ml de xileno (4.5).

6.1.4 - Juntar gota a gota 5 ml de ácido clorídrico (4.3) e homogeneizar (5.3).

6.1.5 - Juntar, com a ajuda de uma pipeta, 0,5 ml de solução do padrão interno de trietilclorosilano (4.9) no tubo de centrífuga (5.6).

6.1.6 - Fechar o tubo de centrífuga por meio da tampa de rosca e misturar cuidadosamente durante quarenta e cinco minutos com a ajuda do agitador (5.4) regulado a 150 vibrações/min.

6.1.7 - Centrifugar durante dez minutos a uma velocidade tal que se obtenha uma separação nítida das fases.

Desrolhar o tubo, recolher a fase orgânica e injectar 3 µl na coluna do cromatógrafo de fase gasosa (5.2).

São necessários cerca de vinte minutos para que todos os componentes estejam eluídos.

6.1.8 - Repetir a injeção, calcular a razão média da área dos picos ATEFS/ACH e ler sobre a curva de calibração (6.3) a quantidade de fluoreto correspondente em miligramas ( $m_1$ ).

6.1.9 - Calcular o teor em fluoreto total da amostra em percentagem de massa (m/m) de fluoreto como indicado no n.º 7.

6.2 - Condições cromatográficas:

6.2.1 - Coluna:

Natureza: ácido inoxidável;

Comprimento: 180 cm;

Diâmetro: 3 mm;

Enchimento: Gaschrom Q 80-100 mesh;

Fase estacionária: óleo de silicone DC 200 (ou equivalente): 20%.

Estabilizar a coluna durante uma noite a 100°C, sendo o débito do gás de arrastamento de 25 ml/min. de azoto. Esta operação é repetida todas as noites. Para todas as quatro ou cinco injeções, reestabilizar a coluna por aquecimento durante cerca de meia hora a 100°C.

Temperatura:

Coluna: 70°C;

Injector: 150°C;

Detector: 250°C;

Gás vector: azoto a 135 ml/min.

6.3 - Curva de calibração:

6.3.1 - Introduzir, com uma pipeta, numa série de seis tubos de centrífuga (5.6), 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml e 5 ml da solução padrão de fluoreto diluído (4.7.2). Completar o volume de cada tubo até 5 ml com água (4.2).

6.3.2 - Proceder como indicado nos n.ºs 6.1.3 a 6.1.6, inclusive.

6.3.3 - Injectar 3 µl de fase orgânica na coluna do cromatógrafo em fase gasosa (5.2).

6.3.4 - Repetir a injeção e calcular a razão média das áreas dos picos ATEFS/ACH.

6.3.5 - Construir uma curva de calibração relacionando a massa de fluoreto (miligramas) nas soluções padrão (6.3.1) e a razão das áreas dos picos ATEFS/ACH medidas no n.º 6.3.4. Traçar a curva de calibração.

7 - Cálculo:

A concentração de flúor total na amostra é obtida pela fórmula seguinte, em percentagem de massa (m/m):

$$\text{Porcentagem (m/m) de fluoreto} = \frac{m_1}{m} \cdot 100$$

em que:

$m$  = tomada da amostra, em miligramas (6.1.2);

$m_1$  = quantidade de flúor na curva de calibração, em miligramas (6.1.8).

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de flúor da ordem de 0,15% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,012%.

## CAPÍTULO XI

### Compostos organomercuriais - Identificação e doseamento

Objectivo e campo de aplicação:

Este método permite a identificação, nos produtos cosméticos para os olhos, dos derivados organomercuriais utilizados como agentes conservantes.

Aplica-se ao tiomersal (DCI) [2-(etilmercuriotio) benzoato de sódio], bem como ao fenilmercúrio e seus sais.

#### A - Identificação

1 - Princípio:

Os derivados organomercuriais são complexados sob a forma de ditizonatos. Após extracção dos ditizonatos pelo tetracloreto de carbono, procede-se a uma cromatografia em camada fina em gele de sílica. As manchas de ditizonatos aparecem com cor laranja.

2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

2.1 - Ácido sulfúrico a 25% (v/v).

2.2 - Solução de 1,5-difenil-3-tiocarbazona (ditizona): 0,8 mg de ditizona em 100 ml de tetracloreto de carbono (2.4).

2.3 - Azoto.

2.4 - Tetracloreto de carbono.

2.5 - Eluente: hexano e acetona (90:10, em volume).

2.6 - Soluções padrão a 0,001% em água de:

2-(etilmercuriotio) benzoato;

Cloreto de etilmercúrio ou cloreto de metilmercúrio;

Nitrato ou acetato de fenilmercúrio;

Cloreto de mercúrio (II) ou acetato de mercúrio (II).

2.7 - Placas de sílica G prontas para utilização (Merck 5721, ou equivalente).

2.8 - Cloreto de sódio.

3 - Aparelhagem:

3.1 - Material corrente de laboratório.

3.2 - Equipamento corrente para cromatografia em camada fina.

3.3 - Filtro separador de fases.

4 - Técnica:

4.1 - Extração:

4.1.1 - Num tubo de centrífuga, diluir, por trituração, 1 g de amostra em 20 ml de água destilada. Dispersar ao máximo aquecendo a 60°C em banho-maria. Juntar 4 g de cloreto de sódio (2.8), agitar e deixar arrefecer.

4.1.2 - Centrifugar pelo menos durante vinte minutos, a 4500 rpm, de modo a separar a maior parte da fase sólida. Filtrar para uma ampola de decantação e juntar 0,25 ml da solução de ácido sulfúrico (2.1).

4.1.3 - Extrair várias vezes 2 ml ou 3 ml de solução de ditizona (2.2), até que a última fase orgânica fique verde.

4.1.4 - Filtrar por filtro separador de fases (3.3) cada fase orgânica.

4.1.5 - Evaporar à secura sob corrente de azoto (2.3).

4.1.6 - Retomar por 0,5 ml de tetracloreto de carbono (2.4). Aplicar imediatamente esta solução como indicado no n.º 4.2.1.

4.2 - Separação e identificação:

4.2.1 - Aplicar imediatamente sobre a placa de sílica G (2.7) 50 µl da solução em tetracloreto de carbono, obtida no n.º 4.1.6.

Tratar simultaneamente, como indicado no n.º 4.1, 10 ml de solução padrão (2.6) e aplicar sobre a mesma placa 50 µl das soluções obtidas (4.1.6).

4.2.2 - Desenvolver a placa com o eluente (2.5) até uma altura de 15 cm. Os compostos organomercuriais aparecem sob a forma de manchas coradas, cuja coloração é estável, desde que se cubra a placa imediatamente após a evaporação do eluente.

A título indicativo, os Rf obtidos são:

	Rf	Cor
Tiomersal.....	0,33	Laranja.
Cloreto de etilmercúrio.....	0,29	Laranja.
Cloreto de metilmercúrio.....	0,29	Laranja.
Fenil mercúrio e seus sais.....	0,21	Laranja.
Cloreto de mercúrio (II).....	0,10	Laranja.
Acetato de mercúrio (II).....	0,10	Laranja.
1,5-difenil-3-tiocarbazona.....	0,09	Rosa.

## B - Doseamento

1 - Definição:

O teor da amostra em composto organomercurial determinado por este método é expresso em percentagem de massa (m/m) de mercúrio.

2 - Princípio:

O método consiste num doseamento de mercúrio total. É, pois, necessário ter verificado previamente a ausência de mercúrio mineral e identificar o derivado organomercurial contido na amostra. Após mineralização a húmido, o mercúrio libertado é doseado por absorção atómica sem chama.

### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Ácido nítrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,41$ )

3.2 - Ácido sulfúrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,84$ )

3.3 - Água bidestilada.

3.4 - Permanganato de potássio: solução a 7% (m/v).

3.5 - Cloreto de hidroxilamónio: solução a 1,5% (m/v).

3.6 - Peroxodissulfato de dipotássio: solução a 5% (m/v).

3.7 - Dicloreto de estanho: solução a 10% (m/v).

3.8 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,18$ )

3.9 - Lã de vidro impregnada de dicloreto de paládio a 1% (m/m).

### 4 - Aparelhagem:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Aparelho para doseamento do mercúrio por absorção atómica sem chama (técnica do vapor frio) e respectivo material de vidro. Comprimento mínimo da célula de medida: 10 cm.

### 5 - Técnica:

Tomar todas as precauções para o doseamento de vestígios de mercúrio.

#### 5.1 - Mineralização.

5.1.1 - Pesar com exactidão cerca de 150 mg (m) de amostra. Juntar 10 ml de ácido nítrico (3.1) e deixar em contacto, durante três horas, em banho-maria a 55°C num frasco fechado hermeticamente, agitando regularmente.

Efectuar simultaneamente um ensaio em branco.

5.1.2 - Depois de arrefecer, juntar 10 ml de ácido sulfúrico (3.2) e voltar a aquecer durante trinta minutos em banho-maria a 55°C.

5.1.3 - Colocar o balão num banho de gelo fundente e juntar cuidadosamente 20 ml de água (3.3).

5.1.4 - Juntar fracções de 2 ml de uma solução de permanganato de potássio (3.4), até coloração permanente. Colocar durante mais quinze minutos em banho-maria a 55°C.

5.1.5 - Juntar 4 ml de peroxodissulfato de dipotássio (3.6) e continuar o aquecimento em banho-maria a 55°C durante trinta minutos.

5.1.6 - Arrefecer e transferir o conteúdo do balão para balão aferido de 100 ml. Lavar com 5 ml de cloreto de hidroxilamónio (3.5) e com quatro vezes 10 ml de água (3.3). O meio deve ser incolor. Completar o volume com água (3.3).

#### 5.2 - Doseamento:

5.2.1 - Introduzir 10 ml da solução de mineralização (5.1.6) no recipiente de vidro usado para doseamento do mercúrio pelo método do vapor frio (4.2). Diluir com 100 ml de água (3.3), juntar 5 ml de ácido sulfúrico (3.2) e 5 ml de dicloreto de estanho (3.7). Misturar após cada adição. Esperar trinta segundos. Os iões  $Hg^{++}$  são reduzidos a mercúrio metálico. Efectuar a determinação. Seja  $n$  o número observado.

5.2.2 - Colocar lã de vidro impregnada de dicloreto de paládio (3.9) entre o recipiente de redução e a célula de medida do instrumento (4.2). Repetir a operação 5.2.1. Se  $n$  não for igual a zero, a mineralização está incompleta e deve recomeçar-se a análise.

## 6 - Cálculos:

O teor da amostra, expresso em mercúrio em percentagem de massa (m/m), é calculado pela fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de mercúrio} = \frac{n}{m}$$

em que:

$n$  = quantidade de mercúrio, em microgramas, lida no aparelho;

$m$  = massa em miligramas, da tomada de ensaio.

## 7 - Notas:

7.1 - Para melhorar a mineralização, pode ser necessário proceder previamente a uma diluição da tomada de ensaio.

7.2 - No caso em que se poderia suspeitar de uma fixação do mercúrio por absorção sobre o substracto, será necessário efectuar um doseamento por adição de um padrão.

## 8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para teores em mercúrio de 0,007%, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,00035.

## CAPÍTULO XII

### Corantes de oxidação nas tintas para cabelos Identificação e doseamento semiquantitativo

## 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método permite a identificação e o doseamento semiquantitativo das substâncias seguintes nas tintas para cabelos, sob a forma de cremes e líquidos:

Denominação das substâncias	Símbolos
Diaminobenzenos:	
1,2 diaminobenzeno ( <i>o</i> -fenilenodiamina).....	(OFD)
1,3 diaminobenzeno ( <i>m</i> -fenilenodiamina).....	(MFD)
1,4 diaminobenzeno ( <i>p</i> -fenilenodiamina).....	(PFD)
Diaminotoluenos:	
3,4 diaminotolueno ( <i>o</i> -toluilenodiamina).....	(OTD)
2,4 diaminotolueno ( <i>m</i> -toluilenodiamina).....	(MTD)
2,5 diaminotolueno ( <i>p</i> -toluilenodiamina).....	(PTD)
Diaminofenóis:	
2,4 diaminofenol.....	(DAF)
Hidroxiquinona:	
1,4 di-hidroxibenzeno.....	(H)
$\alpha$ -naftol.....	( $\alpha$ -N)

Pirogalhol:	
1,2,3 di-hidroxibenzeno.....	(P)
Resorcina:	
1,3 di-hidroxibenzeno.....	(R)

## 2 - Princípio:

Os corantes de oxidação são extraídos das tintas, a pH 10, na forma de creme ou de líquido, com etanol a 96°, e identificados por cromatografia em camada fina monodimensional (5) e ou bidimensional (6).

A fim de efectuar o doseamento semiquantitativo das substâncias, comparam-se os cromatogramas das amostras, obtidas através de quatro sistemas de desenvolvimento, com o das soluções dos produtos de referência.

## 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Etanol absoluto.

3.2 - Acetona.

3.3 - Etanol a 96° (v/v).

3.4 - Amónia a 25% ( $d_4^{20} = 0,91$ )

3.5 - L (+) ácido ascórbico.

3.6 - Clorofórmio.

3.7 - Ciclo-hexano.

3.8 - Azoto técnico.

3.9 - Tolueno.

3.10 - Benzeno.

3.11 - 1-butanol.

3.12 - 2-butanol.

3.13 - Ácido hipofosforoso a 50%.

3.14 - Reagente diazóico: poder-se-á utilizar:

Um sal de 4-nitro-1-benzenodiazónio estabilizado pelo ião clorobenzeno-sulfonato, por exemplo (vermelho 2 JN de Francolor, ou equivalente); ou

Um sal de 2-cloro-4-nitro-1-benzenodiazónio estabilizado pelo ião naftalenbenzoato, por exemplo (NNCD Reagent - Ref. n.º 74150 da Fluka, ou equivalente).

3.15 - Nitrato de prata.

3.16 - P-dimetilaminobenzaldeído.

3.17 - 2,5-dimetilfenol.

3.18 - Cloreto férrico . 6H<sub>2</sub>O.

3.19 - Ácido clorídrico a 10% (m/v).

3.20 - Substâncias de referência:

As substâncias de referência são as indicadas no título 1, «Objectivo e campo de aplicação».

No caso de compostos aminados, a substância de referência deve ser constituída exclusivamente pelo cloridrato (mono ou di) ou pela própria base.

3.21 - Soluções de referência a 0,5% (m/v):

Preparar uma solução a 0,5% (m/v) de cada uma das substâncias de referência (3.20).

Pesar 50 mg  $\pm$  1 mg de substância de referência num balão aferido de 10 ml.

Juntar 5 ml de etanol a 96° (3.3).

Juntar 250 mg de ácido ascórbico (3.5).

Alcalinizar com a solução amoniacal (3.4) até pH 10 aparente.

Completar a 10 ml com etanol a 96° e misturar.

Notas. - As soluções podem ser conservadas durante uma semana, num local fresco, ao abrigo da luz.

Em certos casos, quando da adição do ácido ascórbico e da amónia, pode produzir-se um precipitado.

Convém então deixar depositar antes de efectuar a tomada de ensaio.

3.22 - Eluentes:

3.22.1 - Acetona, clorofórmio e tolueno (35:25:40, em volume).

3.22.2 - Clorofórmio, ciclo-hexano, etanol absoluto e amónia a 25% (80:10:10:1, em volume).

3.22.3 - Benzeno, butanol secundário e água (50:25:25, em volume). Agitar bem a mistura e tomar a fase superior após decantação à temperatura do laboratório (entre 20°C e 25°C).

3.22.4 - 1-butanol, clorofórmio e reagente M (7:70:23, em volume). Deixar decantar cuidadosamente a 20°C-25°C e tomar a fase inferior.

Preparação do reagente M:

NH<sub>4</sub>OH a 25% (v/v) (3.4): 24 volumes;

Ácido hipofosforoso a 50% (3.13): 1 volume;

H<sub>2</sub>O: 75 volumes.

*Nota.* - Os eluentes que contêm amoníaco devem ser bem agitados imediatamente antes da utilização.

3.23 - Reveladores:

3.23.1 - Reagente diazótico:

Preparar uma solução aquosa a 5% (m/v) do reagente (3.14) escolhido. Esta solução deve ser preparada no momento da utilização.

3.23.2 - Reagente de Ehrlich:

Dissolver 2 g de p-dimetilaminobenzaldeído (3.16) em 100 ml de ácido clorídrico aquoso a 10% (m/v) (3.19).

3.23.3 - 2,5-dimetilfenol-cloreto férrico . 6H<sub>2</sub>O:

Solução 1: dissolver 1 g de dimetilfenol (3.17) em 100 ml de etanol a 96° (3.3).

Solução 2: dissolver 4 g de cloreto férrico . 6H<sub>2</sub>O (3.18) em 100 ml de etanol a 96° (3.3).

Aquando da revelação pulveriza-se, separadamente, em primeiro lugar a solução 1 e depois a solução 2.

3.23.4 - Nitrato de prata amoniacal:

A uma solução aquosa a 5% (m/v) de nitrato de prata (3.15) juntar amónia a 25% (3.4) até à dissolução do precipitado.

Este reagente deverá ser preparado no momento da sua utilização. Não conservar.

## 4 - Aparelhagem:

4.1 - Equipamento de laboratório para cromatografia em camada fina.

4.1.1 - Recipiente de plástico ou de vidro permitindo manter a placa de cromatografia em atmosfera de azoto durante a aplicação e até ao desenvolvimento. Esta precaução é necessária, em virtude da grande oxidabilidade de certos corantes.

4.1.2 - Seringa de 10 µl, graduada de 0,2 µl em 0,2 µl, com uma agulha de secção recta ou, melhor, um repeating dispenser de 50 µl, montado num sistema que permita manter a placa em atmosfera de azoto.

4.1.3 - Placas de sílica pré-preparadas, com a espessura de 0,25 mm e as dimensões de 20 cm x 20 cm (Macherey e Nagel Silice G-HR, ou equivalente).

4.2 - Centrífuga permitindo 4000 rpm.

4.3 - Tubos de centrífuga de 10 ml, com rolha de enroscar.

## 5 - Técnica:

5.1 - Tratamento das amostras:

Ao abrir o tubo, eliminar os primeiros 2 cm ou 3 cm de creme.

Num tubo de centrífuga (4.3), previamente purgado com azoto, introduzir:

300 mg de ácido ascórbico;

3 g de creme ou 3 g de líquido homogeneizado.

Juntar algumas gotas de amónia (3.4), se o pH for inferior a 10, e completar a 10 ml com etanol a 96° (3.3)

Homogeneizar em atmosfera de azoto, tapar e centrifugar a 4000 rpm durante dez minutos. Utilizar a solução sobrenadante.

5.2 - Cromatografia:

5.2.1 - Aplicação:

Aplicar em atmosfera de azoto, sobre uma placa de sílica (4.1.3) e em 9 pontos separados, 1 µl de cada uma das 11 soluções de referência. Estas soluções de referências são referenciadas da seguinte forma:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
R	P	H	PFD	DAF	PTD	OFD	OTD	MFD
MTD	AN							

Por outro lado, colocar sobre cada um dos 10.º e 11.º pontos 2 ml das soluções das amostras obtidas no n.º 5.1.

Conservar a placa em atmosfera de azoto até ao momento em que a mesma for cromatografada.

5.2.2 - Desenvolvimento:

Introduzir a placa numa tina previamente purgada com azoto, saturada com um dos quatro eluentes adequados (3.22), e deixar desenvolver à temperatura ambiente (20°C a 25°C) e na obscuridade no percurso de 15 cm.

Tirar a placa e secá-la em atmosfera de azoto à temperatura ambiente.

5.2.3 - Revelação:

Pulverizar imediatamente a placa com um dos quatro reveladores referidos no n.º 3.23.

5.2.4 - Identificação:

Comparam-se os Rf e as colorações obtidas para a amostra com as das substâncias de referência aplicadas. O quadro I dá, a título informativo, os valores de Rf e as

colorações obtidas para cada substância de referência, em função do eluente e dos reveladores.

Em caso de identificação duvidosa, pode obter-se, por vezes, uma confirmação, juntando à amostra a substância de referência correspondente.

#### 5.2.5 - Doseamento semiquantitativo:

Comparar visualmente a intensidade das manchas correspondentes a cada substância identificada no n.º 5.2.4 com uma gama padrão de concentrações conhecidas e adequadas, obtidas a partir da substância de referência correspondente.

Quando a concentração do componente da amostra é demasiado alta, diluir a solução a aplicar e efectuar um novo doseamento.

## QUADRO I

### Valores de Rf e colorações obtidas imediatamente após a revelação

Produto de referência (3.20)	Eluentes				Reveladores			
	Rf				Colorações			
	3.22.1	3.22.2	3.22.3	3.22.4	Reagente diazóico (3.23.1)	Reagente de Ehrlich (3.23.2)	Reagente de dimetilfenol -cloreto férrico (3.23.3)	Reagente de nitrato de prata (3.23.4)
OFD	0,62	0,60	0,30	0,57	Castanho-claro	—	—	Castanho-claro
MFD	0,40	0,60	0,47	0,48	Castanho-violáceo (*)	Amarelo	Castanho-claro	Castanho-claro
PFD	0,20	0,50	0,30	0,46	Castanho	Vermelho-vivo	Violeta	Cinzento
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	Castanho (*)	Laranja-claro	Castanho-claro	Castanho-acizentado
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	Castanho-avermelhado (*)	Amarelo	Castanho	Negro
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	Castanho	Alanrajado	Violeta (*)	Cinzento
DAF	0,07	—	0	0,05	Castanho (*)	Alanrajado	Violeta	Castanho
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	Alanrajado	Violeta	Negro (*)
α-N	0,90	0,80	0,90	0,75	Castanho-alaranjado	—	Violeta (*)	Negro
P	0,37	—	0,67	0,05	Castanho	Violeta-muito-claro	Castanho-muito-claro	Castanho (*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	Alanrajado(*)	Violeta-claro	Castanho-muito-claro	Castanho-claro

(\*) Indica a melhor revelação

*Nota* — Se o OFD é fracamente revelado, deve utilizar-se o eluente 3.22.3 para o separar nitidamente do OTD

#### 6 - Exame por cromatografia em camada fina bidimensional:

A cromatografia em camada fina bidimensional descrita necessita dos seguintes reagentes:

##### 6.1 - Substâncias e soluções da referência:

6.1.1 - β-naftol (β-N).

6.1.2 - 2-aminofenol (OAF).

6.1.3 - 3-aminofenol (MAF).

6.1.4 - 4-aminofenol (PAF).

6.1.5 - 2-nitro-p-fenilenodiamina (2-NPFD).

6.1.6 - 4-nitro-o-fenilenodiamina (4-NOFD):

Preparar uma solução a 0,5% (m/v) de cada uma das substâncias de referências suplementares como se indica no n.º 3.2.1.

##### 6.2 - Eluente:

6.2.1 - Acetato de etilo, ciclo-hexano e amónia a 25% (65:35:0,5, em volume).

##### 6.3 - Revelador:

Colocar um recipiente de vidro numa tina de desenvolvimento para cromatografia em camada fina com 2 g de iodo cristalizado e fechar a tina.

## 6.4 - Cromatografar:

6.4.1 - Traçar, como se indica na figura 1, duas linhas sobre a camada absorvente de uma placa de cromatografia em camada fina (4.1.3).

6.4.2 - Depositar, sob corrente de azoto, no ponto de partida 1 (figura 1), 1 µl a 4 µl do extracto 5.1. A quantidade depende da intensidade das manchas obtidas no cromatograma (5.2).

6.4.3 - Depositar, entre os pontos 2 e 3 (figura 1), os corantes de oxidação identificados (ou supostamente identificados) no n.º 5.2. Distância entre os pontos: 1,5 cm. Depositar 2 µl de cada uma das soluções de referência, à excepção do DAF, de que é necessário depositar 6 µl. A operação é executada em atmosfera de azoto.

6.4.4 - Recomeçar a operação descrita no n.º 6.4.3 para os pontos de partida 4 e 5 (figura 1) e conservar a placa em atmosfera de azoto até à cromatografia.

6.4.5 - Purgar uma tina de cromatografia com azoto e introduzir uma quantidade adequada de eluente (3.22.2). Colocar a placa (6.4.4) na tina e cromatografar na primeira direcção de eluição (figura 1) na obscuridade.

Cromatografar no percurso de, pelo menos, 13 cm.

6.4.6 - Retirar a placa da tina e colocá-la na tina purgada com azoto (4.1), para evaporar os restos de eluente (durante, pelo menos, sessenta minutos).

6.4.7 - Introduzir, com uma proveta graduada, uma quantidade adequada de eluente (6.2.1) numa tina purgada com azoto, colocando a placa rodada de 90° relativamente à primeira direcção de eluição (6.4.6) na tina e cromatografar nesta segunda direcção na obscuridade até que a frente do solvente tenha atingido a linha traçada previamente sobre a camada absorvente. Tirar a placa da tina e evaporar o eluente ao ar.

6.4.8 - Expor a placa durante dez minutos, na tina de cromatografia, aos vapores de iodo (6.3) e interpretar o cromatograma bidimensional com a ajuda das substâncias de referência cromatografadas ao mesmo tempo (quadro II).

*Nota.* - Para obter uma coloração máxima das manchas, deixar o cromatograma ao ar durante meia hora após a revelação.

6.4.9 - A presença dos corantes de oxidação encontrados no n.º 6.4.8 pode ser confirmada de modo indubitável, recomeçando as operações descritas nos n.os 6.4.1 a 6.4.8, inclusive, admitindo a adição no ponto de partida 1, além da quantidade de extracto indicado no n.º 6.4.2, de 1 µl das substâncias de referência identificadas no n.º 6.4.8.

Se não for encontrada qualquer outra mancha, confirma-se a interpretação do primeiro cromatograma.

## QUADRO II

### Cor das substâncias de referência após cromatografia e revelação pelos vapores de iodo

Substâncias de referência	Cor após revelação pelos vapores de iodo
R.....	Bege.
P.....	Castanho.
α-N.....	Violeta.
β-N.....	Castanho-claro.
H.....	Violeta-acastanhado.

MFD.....	Amarelo-acastanhado.
PFD.....	Violeta-acastanhado.
MTD.....	Castanho-escuro.
PTD.....	Amarelo-acastanhado.
DAF.....	Castanho-escuro.
OAF.....	Laranja.
MAF.....	Amarelo-acastanhado.
PAF.....	Violeta-acastanhado.
2-NPFD.....	Castanho.
4-NOFD.....	Laranja.

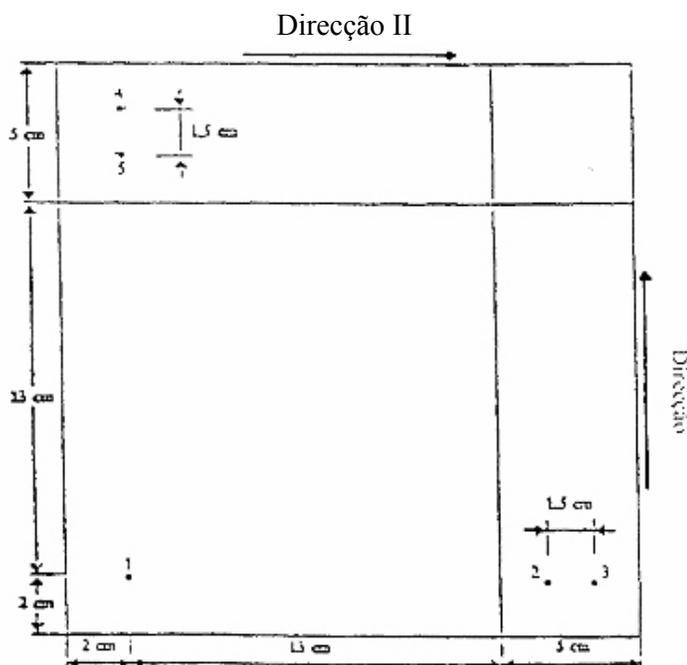


Fig. 1

### CAPÍTULO XIII

#### Diclorometano e 1,1,1-tricloroetano - Doseamento

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento do diclorometano (cloreto de metileno) e do 1,1,1-tricloroetano (metilclorofórmio). Aplica-se aos produtos cosméticos susceptíveis de conter estes produtos.

##### 2 - Definição:

O teor da amostra em diclorometano e em 1,1,1-tricloroetano determinado segundo este método é expresso em percentagem de massa (m/m).

##### 3 - Princípio:

O doseamento efectua-se por cromatografia em fase gasosa, utilizando o triclorometano (clorofórmio) como padrão interno.

##### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

- 4.1 - Triclorometano ( $\text{CH Cl}_3$ ).
- 4.2 - Tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ).
- 4.3 - Diclorometano ( $\text{CH}_2 \text{Cl}_2$ ).
- 4.4 - 1,1,1-tricloroetano ( $\text{CH}_2 \text{Cl}_2$ ).
- 4.5 - Acetona.
- 4.6 - Azoto.

#### 5 - Aparelhagem:

- 5.1 - Material corrente de laboratório e de cromatografia em fase gasosa.
- 5.2 - Cromatógrafo munido de um detector catarométrico.
- 5.3 - Dispositivo de recolha de 50 ml-100 ml (v. em «Tratamento das amostras para laboratório», n.º 5.3).
- 5.4 - Seringa para gases, sob pressão (v. em «Tratamento das amostras para laboratório», n.º 5.4.22).

#### 6 - Técnica:

6.1 - Amostra não pressurizada: pesar exactamente a amostra num matrás com rolha. Introduzir uma quantidade, pesada com exactidão, de  $\text{CH Cl}_3$  (4.1) equivalente à quantidade pressuposta de  $\text{CH}_2 \text{Cl}_2$  e  $\text{CH}_3 \text{CCl}_3$  contida na amostra e homogeneizar.

6.2 - Amostra pressurizada: utilizar o método para a tomada de ensaio descrito no capítulo «Amostragem».

Todavia, ter o maior cuidado com a precisão das indicações seguintes.

6.2.1 - Introduzir no dispositivo de recolha (5.3) uma quantidade de padrão interno (4.1) equivalente à quantidade pressuposta de  $\text{CH}_2 \text{Cl}_2$  e ou  $\text{CH}_3 \text{CCl}_3$  contida na amostra.

Homogeneizar. Lavar o «volume morto» da válvula do dispositivo de recolha (5.3) com 0,5 ml de  $\text{CCl}_4$  (4.2), que se deixa evaporar. Determinar a massa do padrão interno por pesagem diferencial do dispositivo de recolha (5.3).

6.2.2 - A ponta em teflon da seringa, após enchimento com a amostra, deve ser submetida a uma corrente de azoto (4.6), de tal modo que antes da injeção no cromatógrafo não subsista qualquer resíduo da amostra.

6.2.3 - Após cada aplicação, a ponta da válvula ou eventual peça de transferência utilizada deve ser lavada várias vezes com acetona (4.5) (com uma seringa hipodérmica) e em seguida bem seca com azoto (4.6).

6.2.4 - Para cada análise, proceder às determinações utilizando dois dispositivos de recolha (5.3) diferentes, efectuando cinco medidas por dispositivo.

#### 7 - Condições cromatográficas:

##### 7.1 - Pré-coluna:

Tubo inoxidável;  
Comprimento: 30 cm;  
Diâmetro: 3 mm ou 6 mm;  
Enchimento: Chromosorb com as mesmas características que o da coluna.

##### 7.2 - Coluna:

A fase estacionária é constituída por Halicomid M 18 em Chromosorb. Deve permitir um grau de resolução (R) igual a 1,5, pelo menos:

$$R = 2 \cdot \frac{d'r_2 - d'r_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$r_1$  e  $r_2$  = tempo de retenção, expresso em minutos;  
 $W_1$  e  $W_2$  = largura dos picos a meia altura, em milímetros;  
 $d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

7.3 - A título de exemplo, indicam-se as seguintes condições operatórias:

Coluna	I	II
Natureza.....	Tubo inoxidável	Tubo inoxidável.
Comprimento	350 cm	400 cm.
Diâmetro	3 mm	6 mm
Enchimento:		
Chromosorb	WAW	WAW-DMCS-HP.
Granulometria	100-120 <i>mesh</i>	60-80 <i>mesh</i> .
Fase estacionária	Hallcomid M 18 a 10%	Hallcomid M 18 a 20%.
Temperaturas:		
Coluna	65°C	75°C.
Injector	150°C	125°C.
Detector	150°C	200°C.
Gás de arrastamento (hélio):		
Débito	45 ml/min	60 ml/min.
Pressão de entrada	2,5 b	2,0 b.
Injecção	15 µl	15 µl

8 - Determinação dos coeficientes de proporcionalidade:

Preparar num matrás a mistura seguinte, pesada com exactidão:

CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub> (4.3): 30% (m/m) de diclorometano;  
 CH<sub>3</sub> CCl<sub>3</sub> (4.4): 35% (m/m) de tricloroetano;  
 CH Cl<sub>3</sub> (4.1): 35% (m/m) de triclorometano.

Serve para estabelecer os coeficientes de proporcionalidade.

9 - Cálculos:

9.1 - Cálculo de um coeficiente de proporcionalidade de uma substância p em relação a uma substância a escolhida como padrão interno.

Considerando a substância p:

$k_p$  = o seu coeficiente de proporcionalidade;  
 $m_p$  = a sua massa na mistura;  
 $A_p$  = a área do seu pico.

Considerando a substância a:

$k_a$  = o seu coeficiente de proporcionalidade, considerado igual a 1;  
 $m_a$  = a sua massa na mistura;  
 $A_a$  = a área do seu pico.

$$K_p = \frac{m_p \cdot A_a}{m_a \cdot A_p}$$

A título de exemplo, foram obtidos os coeficientes de proporcionalidade seguintes (para CHCl<sub>3</sub>: k = 1):

$$\text{CH}_2\text{Cl}_2: k_1 = 0,78 \pm 0,03$$

$$\text{CH}_3\text{CCl}_3: k_2 = 1,00 \pm 0,03$$

9.2 - Cálculo das percentagens de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub> presentes na amostra a analisar, em que:

$k_1$  = o coeficiente de proporcionalidade de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;  
 $k_2$  = o coeficiente de proporcionalidade de CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub>;  
 $m_a$  = a massa de CHCl<sub>3</sub>;  
 $m_e$  = a massa da amostra a analisar;  
 $A_a$  = a área do pico de CHCl<sub>3</sub>;  
 $A_1$  = a área do pico de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;  
 $A_2$  = a área do pico de CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub>.

Teremos:

$$\text{Percentagem de diclorometano} = \frac{m_a A_1 - K_1 \cdot 100}{A_a \cdot m_e}$$

$$\text{Percentagem de diclorometano} = \frac{m_a A_2 - K_2 \cdot 100}{A_a \cdot m_e}$$

10 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em compostos clorados de 25% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 2,5%.

## CAPÍTULO XIV

### Formaldeído livre - Identificação e doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método compreende uma identificação e dois doseamentos, consoante estejam ou não presentes libertadores de formaldeído. É aplicável a todos os produtos cosméticos.

1.1 - Identificação:

1.2 - Doseamento global por colorimetria com acetilacetona:

Este método aplica-se quando o formaldeído é utilizado isolado ou com outros conservantes não libertadores de formaldeído.

Em caso contrário, e se o resultado ultrapassar a concentração máxima autorizada no produto acabado, utiliza-se o método de confirmação seguinte.

1.3 - Doseamento em presença de libertadores de formaldeído:

No método precedente, durante a derivação os libertadores de formaldeído são clivados e conduzem a resultados demasiado elevados (formaldeído livre e combinado).

É imperioso separar o formaldeído livre por cromatografia líquida.

2 - Definição:

O teor da amostra em formaldeído livre determinado por este método é expresso em percentagem de massa (m/m) de formaldeído.

3 - Identificação:

3.1 - Princípio:

O formaldeído livre e combinado, em meio sulfúrico, confere uma coloração rosa ou malva em presença do reagente de Schiff.

3.2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica e a água desmineralizada.

3.2.1 - Fucsina.

3.2.2 - Sulfito de sódio hepta-hidratado.

3.2.3 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,19$ )

3.2.4 - Ácido sulfúrico 1 M, aproximadamente.

3.2.5 - Reagente de Schiff:

Num copo, pesar 100 mg de fucsina (3.2.1) e dissolver em 75 ml de água a 80°C.

Após arrefecimento, acrescentar 2,5 g de sulfito de sódio (3.2.2) e 1,5 ml de ácido clorídrico (3.2.3).

Completar até 100 ml.

Duração de conservação: duas semanas.

3.3 - Técnica:

3.3.1 - Num copo de 10 ml introduzir cerca de 2 g de amostra.

3.3.2 - Juntar duas gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.2.4) e 2 ml de reagente de Schiff (3.2.5).

Este reagente deve estar rigorosamente incolor no momento da utilização. Agitar e deixar em contacto cinco minutos.

3.3.3 - Se em cinco minutos se observar uma coloração rosa ou malva, a quantidade de formaldeído presente é superior a 0,01%. Efectuar então o doseamento do formaldeído livre e combinado segundo o n.º 4 e, se necessário, o n.º 5.

4 - Doseamento global por colorimetria com acetilacetona:

4.1 - Princípio:

O formaldeído reage com acetilacetona em presença do acetato de amónio para formar a 3-5-diacetil-1-4-di-hidrolutidina. Esta é extraída com 1-butanol. A absorvência do extracto é determinada a 410 nm.

4.2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica e a água desmineralizada.

4.2.1 - Acetato de amónio anidro.

4.2.2 - Ácido acético concentrado ( $d_4^{20} = 1,05$ ).

4.2.3 - Acetilacetona recentemente destilada a pressão reduzida (25 mm Hg 25°C) e que não deve apresentar qualquer absorção a 410 nm.

4.2.4 - 1-butanol.

4.2.5 - Ácido clorídrico 1 M.

4.2.6 - Ácido clorídrico 0,1 M, aproximadamente.

4.2.7 - Hidróxido de sódio 1 M.

4.2.8 - Cozimento de amido recentemente preparado de acordo com a Farmacopeia Portuguesa, 5.<sup>a</sup> ed., 1986, parte I (1 g/50 ml de água).

4.2.9 - Formaldeído a 37%-40%.

4.2.10 - Solução titulada de iodo 0,05 M.

4.2.11 - Solução titulada de tiosulfato de sódio 0,1 M.

4.2.12 - Reagente de acetilacetona:

Num balão aferido de 1000 ml dissolver:

150 g de acetato de amónio (4.2.1);

2 ml de acetilacetona (4.2.3);

3 ml de ácido acético (4.2.2).

Completar até 1000 ml com água (pH da solução: 6,4 aproximadamente).

Este reagente deve ser preparado na altura.

4.2.13 - Reagente (4.2.12) sem acetilacetona.

4.2.14 - Formaldeído padrão: solução mãe:

Num balão aferido de 1000 ml introduzir 5 g de formaldeído (4.2.9) e completar com água até 1000 ml.

Determinação do título da solução mãe:

Tomar 10,00 ml, adicionar 25,00 ml de solução titulada de iodo (4.2.10) e 10 ml de solução de hidróxido de sódio (4.2.7). Deixar repousar durante cinco minutos. Acidificar com 11 ml de HCl (4.2.5) e dosear o iodo em excesso com uma solução titulada de tiosulfato de sódio (4.2.11), em presença de cozimento de amido como indicador.

1 ml desta solução de iodo (4.2.10) consumida corresponde a 1,5 mg de formaldeído.

4.2.15 - Formaldeído padrão - solução diluída:

Efectuar sucessivamente uma diluição 1/20 e depois uma diluição 1/100 da solução mãe em água.

1 ml desta solução mãe contém cerca de 1 µg de formaldeído. Calcular o seu teor exacto.

4.3 - Aparelhos e utensílios:

4.3.1 - Material corrente de laboratório:

4.3.2 - Filtro separador de fase, ref. Whatman 1 PS (ou equivalente).

4.3.3 - Centrifugadora.

4.3.4 - Banho-maria regulado a 60°C.

4.3.5 - Espectrofotómetro.

4.3.6 - Tinas de vidro de 1 cm de percurso óptico.

4.4 - Técnica:

4.4.1 - Solução amostra:

Pesar com a precisão de 0,001 g uma quantidade de amostra correspondente a cerca de 150 µg de formaldeído. Transferir para um balão aferido de 100 ml. Completar até 100 ml com água e misturar (solução S).

Verificar se o pH é próximo de 6; caso contrário, efectuar a diluição na solução de ácido clorídrico (4.2.6).

Num balão de Erlenmeyer de 50 ml juntar:

10,0 ml de solução S;  
5,0 ml de reagente de acetilacetona (4.2.12) e água, até um volume de 30 ml.

#### 4.4.2 - Solução testemunha:

A interferência eventual de uma coloração de fundo na amostra de ensaio é eliminada da seguinte forma:

Num balão de Erlenmeyer de 50 ml juntar:

10,0 ml da solução S;  
5,0 ml de reagente (4.2.13) e água, até um volume de 30 ml.

#### 4.4.3 - Ensaio a branco:

Num balão de Erlenmeyer de 50 ml juntar 5,0 ml de reagente de acetilacetona (4.2.12) e água, até um volume de 30 ml.

#### 4.4.4 - Doseamento:

4.4.4.1 - Agitar as misturas preparadas nos n.os 4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3. Mergulhar os balões em banho-maria a 60°C durante exactamente dez minutos. Arrefecer durante dois minutos num banho de água gelada.

4.4.4.2 - Transferir para uma ampola de decantação de 50 ml contendo exactamente 10 ml de 1-butanol (4.2.4). Lavar com 3 ml a 5 ml de água. Agitar fortemente a mistura durante trinta segundos exactos. Deixar decantar.

4.4.4.3 - Filtrar a fase butanólica por filtro separador de fase (4.3.2) para tinas do espectrofotómetro.

Pode também recorrer-se a uma centrifugação (300 rpm durante cinco minutos).

4.4.4.4 - Determinar a absorvência A(indice 1) a 410 nm do extracto da solução amostra obtida no n.º 4.4.1 em relação ao extracto da solução testemunha (4.4.2).

4.4.4.5 - Da mesma forma, determinar a absorvência A(indice 2) do extracto do ensaio em branco obtido no n.º 4.4.3 em relação a 1-butanol.

N. B. - Todas estas operações devem ser executadas num período de vinte e cinco minutos a partir do momento em que o balão é colocado em banho-maria a 60°C.

#### 4.4.5 - Curva de calibração:

4.4.5.1 - Num balão de Erlenmeyer de 50 ml juntar:

5,0 ml de solução padrão diluída (4.2.15);  
5,0 ml de reagente de acetilacetona (4.2.12) e água, até um volume final de 30 ml.

4.4.5.2 - Continuar segundo as indicações (4.4.4) e determinar a absorvência em relação ao 1-butanol (4.2.4).

4.4.5.3 - Repetir o processo com 10 ml, 15 ml, 20 ml e 25 ml de solução padrão diluída (4.2.15).

4.4.5.4 - Para obter o valor do ponto 0 (correspondente a coloração dos reagentes), proceder como no n.º 4.4.4.5.

4.4.5.5 - Construir a curva de calibração após subtracção do valor do ponto 0 de cada uma das absorvências obtidas nos n.os 4.4.5.1 e 4.4.5.3.

A lei de Beer aplica-se até 30 µg de formaldeído.

#### 4.5 - Cálculos:

4.5.1 - Subtrair  $A_2$  de  $A_1$  e ler sobre a curva de calibração (4.4.5.5) a quantidade C, expressa em microgramas, de formaldeído contido na solução 4.4.1.

4.5.2 - O teor em formaldeído da amostra em percentagem de massa (m/m) é calculado segundo a fórmula:

$$\text{Formaldeído} = \frac{C}{10^3 \cdot m}$$

$m$  = massa, em gramas, da tomada de ensaio

4.6 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em formaldeído de 0,2%, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não dever ultrapassar 0,005% para o doseamento colorimétrico com acetilacetona.

Se o doseamento do formaldeído conduzir a resultados superiores aos previstos na Portaria n.º 613/87, de 16 de Julho, a saber:

- a) Compreendidos entre 0,05% e 0,2%, quando não indicado no rótulo;
- b) Superiores a 0,2%, quando indicado ou não no rótulo;

é obrigatório proceder segundo o método descrito n.º 5.

5 - Doseamento em presença de libertadores de formaldeído:

5.1 - Princípio:

O formaldeído separado é transformado em derivado lutidínico amarelo por reacção com a acetilacetona num reactor pós-coluna. O derivado formado é doseado por espectrofotometria a 420 nm.

5.2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica e a água desmineralizada.

5.2.1 - Água de qualidade HPLC.

5.2.2 - Acetato de amónio anidro.

5.2.3 - Ácido acético ( $d_4^{20} = 1,05$ ).

5.2.4 - Acetilacetona (conservada a 4°C).

5.2.5 - Fosfato dissódico anidro.

5.2.6 - Ácido ortofosfórico a 85% ( $d_4^{20} = 1,7$ )

5.2.7 - Metanol.

5.2.8 - Diclorometano.

5.2.9 - Formaldeído a 37%-40%.

5.2.10 - Hidróxido de sódio 1 M.

5.2.11 - Ácido clorídrico 1 M.

5.2.12 - Ácido clorídrico 0,002 M.

5.2.13 - Cozimento de amido recentemente preparado de acordo com a Farmacopeia Portuguesa.

5.2.14 - Solução titulada de iodo 0,05 M.

5.2.15 - Solução titulada de tiosulfato de sódio 0,1 M.

5.2.16 - Fase móvel:

Solução aquosa de fosfato dissódico (5.2.5) 0,006 M ajustado a um pH 2,1 com ácido ortofosfórico (5.2.6).

5.2.17 - Reagente pós-coluna:

Dissolver num balão aferido de 1000 ml:

62,5 g de acetato de amónio (5.2.2);

7,5 ml de ácido acético (5.2.3);  
5 ml de acetilacetona (5.2.4).

Completar até 1000 ml com água (5.2.1). Manter o reagente ao abrigo da luz.  
Conservação: máximo de três dias a 25°C. Não deve verificar-se alteração da cor.

5.2.18 - Formaldeído padrão - solução mãe:

Num balão aferido de 1000 ml introduzir 10 g de formaldeído (5.2.9) e completar com água até 1000 ml.

Determinação do título da solução mãe:

Tomar 5,0 ml, adicionar 25,0 ml da solução titulada de iodo (5.2.14) e 10 ml de solução de hidróxido de sódio (5.2.10). Deixar repousar durante cinco minutos. Acidificar com 11,0 ml de HCl (5.2.11) e dosar o iodo em excesso com uma solução titulada de tiosulfato de sódio (5.2.15), em presença de cozimento de amido (5.2.13) como indicador.

1 ml de solução de iodo (5.2.14) consumida corresponde a 1,5 mg de formaldeído.

5.2.19 - Formaldeído padrão - solução diluída:

Efectuar uma diluição a  $\frac{1}{100}$  da solução-mãe na fase móvel (5.2.16).

1 ml desta solução contém cerca de 37 µg de formaldeído; calcular o seu teor exacto.

5.3 - Aparelhos:

5.3.1 - Material corrente de laboratório.

5.3.2 - Uma bomba HPLC sem pulsações.

5.3.3 - Uma bomba de baixa pressão sem pulsações para o reagente (ou uma segunda bomba HPLC com as mesmas características da primeira).

5.3.4 - Uma válvula de injeção munida de uma ansa de 10 µl.

5.3.5 - Reactor pós-coluna com os seguintes elementos:

Um balão de três tubuladuras de 1 l;

Um aquecedor de balões de 1 l;

Duas colunas Vigreux com um mínimo de 10 patamares (refrigerante a ar);

Um tubo inox (para permuta térmica) - Ø ext.: 1,6 mm; Ø int.: 0,23 mm; comprimento: 400 mm;

Tubo de teflon - Ø ext.: 1,6 mm; Ø int.: 0,30 mm; comprimento: 5 m (tricotin) (v. anexo 1);

Um «T» sem volume morto (Valco, ou equivalente);

Três junções Union sem volume morto, ou um módulo pós-coluna do tipo Applied Biosystems PCRS 520, ou equivalente, munido de um reactor de 1 ml.

5.3.6 - Membrana filtrante de 0,45 µ.

5.3.7 - Cartucho Seppak RC<sub>18</sub> (ou equivalente).

5.3.8 - Colunas prontas para uso:

Bischoff hypersil RP 18 (tipo NC, ref. C 25.46 1805) (5 µ; comprimento: 250 mm; Ø int.: 4,6 mm), ou Dupont, Zorbax ODS (5 µ; comprimento: 250 mm; Ø int.: 4,6 mm), ou Phase SEP, spherisorb ODS 2 (5 µ; comprimento: 250 mm; Ø int.: 4,0 mm).

5.3.9 - Pré-coluna:

Bischoff K1 hypersil RP 18 (ref. K1 G 6301 1805), ou equivalente (5 µ; comprimento: 10 mm).

5.3.10 - A coluna e a pré-coluna são ligadas por um sistema Ecotube (ref. A 15020508 Bischoff), ou equivalente.

5.3.11 - Efectuar a montagem (5.3.5) segundo o esquema do anexo 2.

As ligações a seguir à válvula de injeção devem ser o mais curtas possível. Neste caso, o tubo inox colocado entre a saída do reactor e a entrada do detector tem por objectivo arrefecer a mistura antes da detecção. A temperatura dentro do detector não é conhecida, mas é constante.

5.3.12 - Detector de UV/visível.

5.3.13 - Registador.

5.3.14 - Centrifugadora.

5.3.15 - Banho de ultra-sons.

5.3.16 - Agitador (tipo Vortex, ou equivalente).

5.4 - Técnica:

5.4.1 - Curva de calibração:

Obtém-se medindo a altura dos picos em função da concentração. As soluções padrão obtém-se por diluição da solução diluída de formaldeído padrão (5.2.19) na fase móvel (5.2.16):

1,0 ml de solução padrão (5.2.19) diluída a 20,0 ml: cerca de 185 µg/100 ml;

2,0 ml de solução padrão (5.2.19) diluída a 20,0 ml: cerca de 370 µg/100 ml;

5,0 ml de solução padrão (5.2.19) diluída a 25,0 ml: cerca de 740 µg/100 ml;

5,0 ml de solução padrão (5.2.19) diluída a 20,0 ml: cerca de 925 µg/100 ml.

As soluções padrão são guardadas durante uma hora à temperatura do laboratório e devem ser preparadas no momento. A linearidade da curva de calibração é adequada para concentrações de 1,00 µg/ml a 15,00 µg/ml.

5.4.2 - Preparação de amostras:

5.4.2.1 - Emulsões (cremes, bases, eyeliners):

Pesar, com a precisão de 0,001 g, uma quantidade de amostra correspondente a cerca de 100 µg de formaldeído. Transferir para tubo de centrífuga de 100 ml. Juntar 20 ml de diclorometano (5.2.8) e 20,0 ml de ácido clorídrico (5.2.12). Misturar utilizando o agitador (5.3.16) e ultra-sons (5.3.15). Separar as duas fases por centrifugação (3000 rpm durante dois minutos). À parte, lavar um cartucho (5.3.7) com 2 ml de metanol (5.2.7) e condicioná-lo com 5 ml de água (5.2.1). Fazer passar 4 ml da fase aquosa do extracto através do cartucho condicionado, eliminar os primeiros 2 ml e recuperar a fracção seguinte.

5.4.2.2 - Loções e champôs:

Pesar, com a precisão de 0,001 g, uma quantidade de amostra correspondente a cerca de 100 µg de formaldeído. Transferir para um balão volumétrico de 100 ml. Completar até 100 ml com a fase móvel (5.2.16). A solução é filtrada através da membrana filtrante (5.3.6) e injectada ou passada através de um cartucho (5.3.7) condicionado como no n.º 5.4.2.1.

Todas as soluções devem ser injectadas imediatamente.

5.4.3 - Condições cromatográficas:

Débito da fase móvel: 1 ml/min.;

Débito do reagente: 0,5 ml/min.;

Débito total à saída do detector: 1,5 ml/min.;

Volume injectado: 10 µl;

Temperatura de eluição: nas separações difíceis, a coluna é imersa num banho de gelo em fusão - aguardar que as temperaturas se equilibrem (quinze a vinte minutos);

Temperatura de reacção pós-coluna: 100°C;

Deteção: 420 nm.

N. B. - O conjunto do sistema cromatográfico e pós-coluna deve ser lavado com água (5.2.1) depois da utilização. No caso de uma interrupção superior a dois dias, esta lavagem deve ser seguida de uma lavagem com metanol. Antes de recondicionar o sistema, passá-lo por água, para evitar recristalizações.

5.5 - Cálculos:

Teor em formaldeído em percentagem de massa (m/m):

$$\frac{C \cdot 10^{-6} \cdot 100}{5 m} = \frac{C \cdot 10^{-4}}{5 m}$$

Loções e champôs (5.4.2.2):

Teor em formaldeído:

$$\frac{C \cdot 10^{-6} \cdot 100}{5 m} = \frac{C \cdot 10^{-4}}{5 m}$$

em que:

$m$  = massa, em gramas, da amostra submetida em análise;

$C$  = concentração, em microgramas/100 ml, de formaldeído lida na curva da calibração (5.4.1).

5.6 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em formaldeído de 0,05%, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados com a mesma amostra não deve ultrapassar 0,001%.

Para um teor em formaldeído de 0,2%, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados com a mesma amostra não deve ultrapassar 0,005%.

## ANEXO 1

### Construção de um *tricotin*

Acessórios utilizados para construção do *tricotin*:

Um cilindro de madeira:

Diâmetro externo de 5 cm; no meio do cilindro é feito um furo de 1,5 cm.

Pregam-se quatro puas de aço de forma a ficarem equidistantes (v. o esquema do cilindro - figuras 1 e 2). Distância entre duas puas: 1,8 cm.

Distância entre uma pua e o furo central: 0,5 cm;

Uma haste rígida (de tipo agulha de crochet) para fazer as laçadas a partir do tubo de teflon;

Tubo de teflon - Ø ext.: 1,6 mm; Ø int.: 0,3 mm; comprimento: 5 m.

**Funcionamento do *tricotin*:**

Para fazer funcionar o *tricotin* é necessário enfiar o tubo de teflon de cima para baixo através do tubo central do cilindro (deixando sair pela face inferior cerca de 10 cm de tubo, o que permitirá puxar ligeiramente o cordão que vai sendo confeccionado) e enrolar o tubo à volta de cada uma das quatro puas para efectuar a primeira volta (v. figura 3).

A entrada e a saída do *tricotin* são providas de casquilho e parafusos de pressão: é necessário ter cuidado para não esmagar o teflon durante a montagem.

A partir da segunda volta fazer passar o tubo pelo exterior de cada pua, para em seguida formar uma laçada da seguinte forma: fazer passar o tubo da volta inferior sobre o tubo da volta superior com a ajuda da haste rígida (v. figura 4).

Este trabalho deve ser repetido para cada uma das puas respeitando a ordem 1-2-3-4, até se obterem os 5 m ou o comprimento desejado. Deixar cerca de 10 cm de tubo para fechar o cordão. Passar o tubo por dentro de cada uma das quatro laçadas e puxar ligeiramente, fechando, assim, o cordão.

*N. B.* - Existem no mercado tricotins fabricados para reacções pós-coluna (SUPELCO).

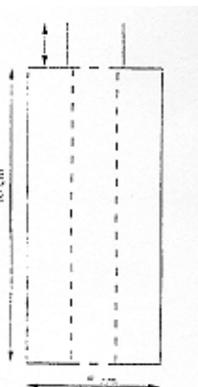


Fig. 1

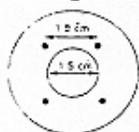
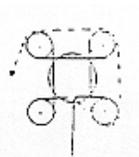


Fig. 2



1.ª volta

Fig. 3



2.<sup>a</sup> volta

Para formar a laçada passar o tubo inferior (a cheio) por cima do 2.º tubo (a tracejado).

Fig. 4

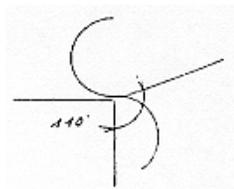
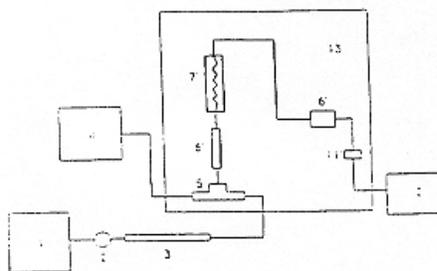


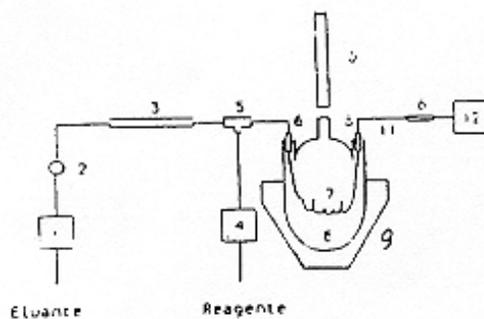
Fig. 5

## ANEXO 2

5.3.5:



5.3.6:



- 1—Bomba HPLC (5.3.2).
- 2—Válvula de injeção (5.3.4).
- 3— Coluna com pré-coluna.
- 4—Bomba do reagente.
- 5—«T» sem volume morto.
- 5'—«T» (vortex).
- 6-6'—Junção *Union* sem volume morto.
- 7—*Tricotim*.
- 7'—Reactor.
- 8—Balão de três tubuladuras com água a ferver.
- 9—Aquecedor de balões.
- 10—Refrigerante.
- 11—Tubo inox de troca térmica.

- 12—Detector de UV/visível.  
13—Módulo pós-coluna PCRS 520.

## CAPÍTULO XV

### Hexaclorofeno - Identificação

#### A - Identificação

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método é aplicável a todos os produtos cosméticos.

##### 2 - Princípio:

O hexaclorofeno contido na amostra é extraído pelo acetato de etilo e identificado por cromatografia em camada fina.

##### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Solução de ácido sulfúrico 8 N.

3.2 - Celite AW.

3.3 - Acetato de etilo.

3.4 - Eluente: benzeno contendo 1% (v/v) de ácido acético glacial.

3.5 - Revelador n.º 1:

Solução de rodamina B: dissolver 100 mg de rodamina B numa mistura de 150 ml de óxido de dietilo, 70 ml de etanol absoluto e 16 ml de água.

3.6 - Revelador n.º 2:

Solução de 2,6-dibromo-4-(cloroimino) ciclo-hexa-2,5-dienona: dissolver 400 mg de 2,6-dibromo-4-(cloroimino) ciclo-hexa-2,5-dienona em 100 ml de metanol (a preparar diariamente).

Solução de carbonato de sódio: dissolver 10 g de carbonato de sódio em 100 ml de água desmineralizada.

3.7 - Solução padrão:

Solução de 0,05% (m/v) de hexaclorofeno em acetato de etilo (3.3).

##### 4 - Aparelhagem:

4.1 - Placas para cromatografia em camada fina de sílica F<sub>254</sub> de 20 cm x 20 cm.

4.2 - Material corrente de laboratório para cromatografia em camada fina.

4.3 - Banho termostático para 26°C.

##### 5 - Preparação da amostra:

5.1 - Misturar cuidadosamente 1 g de amostra homogeneizada com 1 g de celite AW (3.2) e 1 ml de solução de ácido sulfúrico (3.1).

5.2 - Secar a 100°C durante duas horas.

5.3 - Arrefecer e reduzir o resíduo seco a pó fino.

5.4 - Extrair duas vezes com 10 ml de acetato de etilo (3.3) de cada vez. Centrifugar após cada extracção e juntar as fases de acetato de etilo.

5.5 - Evaporar a 60°C.

5.6 - Dissolver o resíduo em 2 ml de acetato de etilo (3.3).

#### 6 - Técnica:

6.1 - Aplicar 2 µl de solução da amostra 5.6 e 2 µl de solução padrão (3.7) sobre uma placa (4.1).

6.2 - Saturar a tina termostatada a 26°C com eluente (3.4).

6.3 - Colocar a placa de cromatografia em camada fina na tina e desenvolver até 15 cm.

6.4 - Retirar a placa e secar na estufa a 105°C.

6.5 - Revelação:

Revelam-se as manchas de hexaclorofeno como indicado nos n.os 6.5.1 ou 6.5.2.

6.5.1 - Pulverizar o revelador n.º 1 (3.5) de modo uniforme sobre a placa. Passados trinta minutos, examinar a placa com luz UV de 254 nm.

6.5.2 - Pulverizar o revelador n.º 2 (3.6) utilizando sucessivamente a solução de 2,6-dibromo-4-(cloroimino) ciclo-hexa-2,5-dienona e em seguida a solução de carbonato de sódio. Examinar a placa à luz do dia após dez minutos de secagem à temperatura ambiente.

#### 7 - Interpretação dos resultados:

7.1 - Revelador n.º 1 (3.5):

O hexaclorofeno é revelado sob forma de manchas azuladas sobre fundo amarelo-laranja, fluorescente e apresenta um Rf de 0,5, aproximadamente.

7.2 - Revelador n.º 2 (3.6):

O hexaclorofeno é revelado sob forma de manchas de azul-celeste a azul-turquesa sobre fundo branco e apresenta um Rf de 0,5, aproximadamente.

## CAPÍTULO XVI

### Hidróxidos de sódio e de potássio livres Identificação e doseamento

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método descreve o procedimento que permite identificar os produtos cosméticos contendo quantidades importantes de hidróxidos de sódio e ou de potássio livres e dosear estes hidróxidos nos produtos de desfrisagem dos cabelos e nos solventes da cutícula das unhas.

#### 2 - Definição:

O hidróxido de sódio e de potássio livre define-se como sendo o volume de ácido de referência necessário para neutralizar o produto em condições determinadas e exprime-se sob a forma de hidróxido de sódio livre.

#### 3 - Princípio:

A amostra é dissolvida ou dispersa em água e titulada com o ácido de referência. Regista-se a variação do valor do pH ao mesmo tempo que se acrescenta o ácido: para uma solução simples de hidróxidos de sódio ou potássio, o fim da titulação corresponde a uma variação precisa do valor do pH registado.

A curva de titulação normal pode ser modificada pela presença de:

- a) Amónia e outras bases orgânicas fracas, que apresentam, elas próprias, uma curva de titulação bastante plana. Neste caso, a amónia é eliminada por evaporação sob pressão reduzida, à temperatura ambiente;

- b) Sais de ácidos fracos, o que pode originar uma curva de titulação apresentando vários pontos de inflexão. Neste caso, só a primeira parte da curva, até ao primeiro destes pontos de inflexão, corresponde à neutralização do ião hidróxido proveniente do hidróxido de sódio e de potássio livre.

Preconiza-se um outro procedimento de titulação, no álcool, quando é indicado que existe uma interferência excessiva dos sais de ácidos inorgânicos fracos. Se bem que seja teoricamente possível encontrar outras bases fortes solúveis, tais como hidróxido de lítio ou hidróxido de amónio quaternário, que dão um pH elevado, a sua presença neste tipo de produtos cosméticos é altamente improvável.

#### 4 - Identificação:

##### 4.1 - Reagentes:

4.1.1 - Solução tampão alcalina de referência de pH 9,18 a 25°C: solução 0,05 M de tetraborato de sódio.

##### 4.2 - Aparelhagem:

4.2.1 - Material corrente de laboratório.

4.2.2 - Potenciómetro.

4.2.3 - Eléctrodo de vidro.

4.2.4 - Eléctrodo de referência de calomelanos.

##### 4.3 - Técnica:

Aferir o aparelho de medida por meio da solução tampão de referência (4.1.1). Preparar uma solução ou dispersão a 10% do produto a analisar em água e filtrar. Determinar o pH. Se for igual ou superior a 12, é necessário efectuar um doseamento.

#### 5 - Doseamento:

##### 5.1 - Titulação em meio aquoso:

##### 5.1.1 - Reagentes:

5.1.1.1 - Solução 0,1 N de ácido clorídrico titulada.

##### 5.1.2 - Aparelhagem:

5.1.2.1 - Material corrente de laboratório.

5.1.2.2 - Potenciómetro, de preferência com registador.

5.1.2.3 - Eléctrodo de vidro.

5.1.2.4 - Eléctrodo de referência de calomelanos.

##### 5.1.3 - Técnica:

Pesar com precisão, num copo de 150 ml, uma tomada de ensaio de 0,5 g a 1 g. Na presença de amoníaco, juntar algumas bolas de vidro, colocar o copo num exsiccador para vácuo, proceder ao vácuo até que o cheiro de amoníaco desapareça (cerca de três horas). Dissolver ou dispersar o resíduo em 100 ml de água. Titular com uma solução de ácido clorídrico 0,1 N (5.1.1.1), registando a variação do pH (5.1.2.2).

##### 5.1.4 - Cálculos:

Determinar os pontos de inflexão da curva de titulação. Quando o primeiro ponto de inflexão aparece a um pH inferior a 7, a amostra não contém hidróxido de sódio ou de potássio. Quando se formam dois ou vários pontos de inflexão na curva, só o primeiro é tomado em consideração. Anotar o volume da solução de titulação neste primeiro ponto de inflexão.

Seja:

$V$  = o volume da solução de titulação, em mililitros;

$M$  = a massa da tomada de ensaio, em gramas.

A concentração em hidróxidos de sódio e, ou de potássio é expressa em percentagem (m/m) de hidróxido de sódio pela fórmula:

$$\text{Percentagem de hidróxido de sódio} = 0,4 \frac{V}{M}$$

Pode acontecer que, apesar da indicação da presença de uma quantidade bastante importante de hidróxidos de sódio e ou potássio, a curva de titulação não apresente ponto de inflexão distinto. Neste caso, convém proceder a um novo doseamento em isopropanol.

5.2 - Titulação em isopropanol:

5.2.1 - Reagentes:

5.2.1.1 - Isopropanol.

5.2.1.2 - Solução aquosa titulada 1,0 N de ácido clorídrico.

5.2.1.3 - A solução 0,1 N de ácido clorídrico no isopropanol é preparada imediatamente antes da utilização por diluição da solução aquosa de ácido clorídrico 1,0 N, com isopropanol.

5.2.2 - Aparelhagem:

5.2.2.1 - Material corrente de laboratório.

5.2.2.2 - Potenciómetro, de preferência com registador.

5.2.2.3 - Eléctrodo de vidro.

5.2.2.4 - Eléctrodo de referência de calomelanos.

5.2.3 - Técnica:

Pesar com precisão, num copo de 150 ml, uma tomada de ensaio entre 0,5 g e 1 g. Na presença de amoníaco, juntar algumas bolas de vidro, colocar o copo num exsiccador para vácuo e proceder ao vácuo até que o cheiro de amoníaco desapareça (cerca de três horas). Dissolver ou dispersar o resíduo em 100 ml de isopropanol. Titular com a solução 0,1 N de ácido clorídrico no isopropanol (5.2.1.3) registando a variação do pH aparente (5.2.2.2).

5.2.4 - Cálculos:

O mesmo método que no n.º 5.1.4. O primeiro ponto de inflexão é visível a um pH aparente de cerca de 9.

5.3 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para teores da ordem dos 5% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,25%.

## CAPÍTULO XVII

### 8-hidroxiquinoleína e seu sulfato Identificação e dosamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método descreve a identificação e o doseamento de 8-hidroxiquinoleína e do seu sulfato.

2 - Definição:

O teor da amostra em 8-hidroxiquinoleína determinado segundo este método é expresso em percentagem de massa (m/m) de 8-hidroxiquinoleína.

### 3 - Princípio:

#### 3.1 - Identificação:

É efectuada por cromatografia em camada fina.

#### 3.2 - Doseamento:

É efectuada por espectrofotometria em 410 nm de um complexo de cobre obtido por reacção com o licor de Fehling.

### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

#### 4.1 - 8-hidroxiquinoleína.

4.2 - Benzeno (tendo em conta a toxicidade do produto, tomar as precauções adequadas).

#### 4.3 - Clorofórmio.

#### 4.4 - Solução de hidróxido de sódio a 50% (m/m).

#### 4.5 - Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ).

#### 4.6 - Tartarato duplo de potássio e de sódio.

#### 4.7 - Ácido clorídrico 1 N.

#### 4.8 - Ácido sulfúrico 1 N.

#### 4.9 - Solução de hidróxido de potássio 1 N.

#### 4.10 - Etanol.

#### 4.11 - 1-butanol.

#### 4.12 - Ácido acético glacial.

#### 4.13 - Ácido clorídrico 0,1 N.

#### 4.14 - Celite 545, ou equivalente.

#### 4.15 - Soluções padrão:

4.15.1 - Colocar 100 mg de 8-hidroxiquinoleína (4.1) num balão aferido de 100 ml e dissolver numa pequena quantidade de ácido sulfúrico 1 N (4.8). Completar o volume com ácido sulfúrico 1 N (4.8).

4.15.2 - Colocar 100 mg de 8-hidroxiquinoleína (4.1) num balão aferido de 100 ml. Dissolver no etanol (4.10). Completar o volume com o mesmo solvente e misturar.

#### 4.16 - Licor de Fehling:

Solução A: num balão aferido de 100 ml pesar 7 g de sulfato de cobre (4.5). Dissolver numa pequena quantidade de água, completar o volume com água e misturar.

Solução B: num balão aferido de 100 ml pesar 35 g de tartarato duplo de potássio e de sódio (4.6) e dissolvê-los em 50 ml de água. Juntar 20 ml de hidróxido de sódio a 50% (4.4). Completar o volume com água e misturar.

Imediatamente antes da utilização, para um balão aferido de 100 ml, pipetar 10 ml de solução A e 10 ml de solução B. Completar o volume com água e misturar.

#### 4.17 - Eluentes:

Eluente I: 1-butanol, ácido acético e água (80:20:20, em volume).

Eluente II: clorofórmio e ácido acético (95:5, em volume).

4.18 - Solução a 1% de 2,6-dicloro-4-(cloroimino) ciclo-hexa-2,5-dienona em etanol (4.10).

#### 4.19 - Solução de carbonato de sódio a 1% (m/v).

#### 4.20 - Solução a 30% (v/v) de etanol (4.10) em água.

#### 4.21 - Solução de di-hidrogenoetilenodiaminatetra-acetato dissódico a 5% (m/v).

#### 4.22 - Solução tampão de pH 7:

Pesar 27 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 70 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  num balão aferido de 1 l. Dissolver. Completar o volume e misturar.

4.23 - Placas para cromatografia em camada fina de sílica prontas para utilização, com a espessura de 0,25 mm (Kieselgel 60 Merck, ou equivalente). Antes da utilização, cada placa deve ser pulverizada com 10 ml do reagente 4.21 e seca a 80°C.

5 - Aparelhagem:

5.1 - Balões esmerilados de fundo redondo de 100 ml.

5.2 - Balões aferidos.

5.3 - Pipetas graduadas de 10 ml e 5 ml.

5.4 - Pipetas aferidas de 20 ml, 15 ml, 10 ml e 5 ml.

5.5 - Ampolas de decantação de 100 ml, 50 ml e 25 ml.

5.6 - Filtros de pregas de 9 cm de diâmetro.

5.7 - Evaporador rotativo.

5.8 - Refrigerante de refluxo esmerilado.

5.9 - Espectrofotómetro.

5.10 - Tinas de 1 cm de percurso óptico.

5.11 - Agitador com aquecimento.

5.12 - Coluna de vidro para cromatografia de 160 mm de altura e 8 mm de diâmetro, cuja parte inferior está munida de um estreitamento tapado por tampão de lã de vidro e cuja parte superior é adaptada à eluição sob pressão.

6 - Técnica:

6.1 - Identificação:

6.1.1 - Amostras líquidas:

6.1.1.1 - Depois de ter levado a 7 o pH de uma fracção de amostras a analisar, aplica-se 5 µl e 10 µl em cada um dos pontos da linha de partida de uma placa recoberta de uma camada delgada de gele de sílica, tratada previamente como referido no n.º 4.23.

6.1.1.2 - Sobre dois outros pontos da linha de partida, aplicam-se 10 µl e 30 µl da solução padrão (4.15.2) e seguidamente desenvolve-se a placa com um dos dois eluentes (4.17).

6.1.1.3 - Quando o eluente atingiu 15 cm, a placa é seca a 110°C durante quinze minutos. Com luz UV (366 nm), as manchas de 8-hidroxiquinoleína caracterizam-se por uma fluorescência amarela.

6.1.1.4 - A placa é seguidamente pulverizada com uma solução aquosa de carbonato de sódio a 1% (4.19) e, após a secagem, com uma solução a 1% de 2,6-dicloro-4-(cloroimino) ciclo-hexa-2,5-dienona (4.18). A 8-hidroxiquinoleína aparece na forma de uma mancha azul.

6.1.2 - Amostras sólidas e cremes:

6.1.2.1 - Colocar 1 g de amostra em suspensão em 5 ml da solução tampão de pH 7 (4.22). Transferir com 10 ml de clorofórmio para uma ampola de decantação e agitar. Depois de ter separado a camada clorofórmica, extrair por duas vezes a suspensão aquosa com 10 ml de clorofórmio (4.3). Misturar e filtrar os extractos clorofórmicos para um balão de fundo redondo de 100 ml (5.1). Concentrar até à secura quase total no evaporador rotativo.

Retomar o resíduo em 2 ml de clorofórmio e aplicar 10 µl e 30 µl da solução obtida numa placa de gele de sílica, procedendo como foi indicado no n.º 6.1.1.1.

6.1.2.2 - Após ter aplicado 10 µl e 30 µl da solução padrão (4.15.2), procede-se como indicado nos n.ºs 6.1.1.2, 6.1.1.3 e 6.1.1.4.

6.2 - Doseamento:

6.2.1 - Amostras líquidas:

6.2.1.1 - Num balão esmerilado de fundo redondo de 100 ml pesar 5 g da amostra. Juntar 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.8) e concentrar a mistura até à secura quase total, a pressão reduzida, a 50°C.

6.2.1.2 - Dissolver este resíduo em 20 ml de água quente. Transferir para um balão aferido de 100 ml e lavar por três vezes com 20 ml de água. Completar 100 ml com água e misturar.

6.2.1.3 - Pipetar 5 ml desta solução para uma ampola de decantação de 50 ml (5.5). Depois de se juntar 10 ml de licor de Fehling (4.16), extrair o complexo de cobre formado por três vezes com 8 ml de clorofórmio (4.3).

6.2.1.4 - Juntar as fases clorofórmicas filtradas num balão aferido de 25 ml (5.2). Completar o volume com clorofórmio (4.3) e agitar. Determinar a densidade óptica da solução amarela a 410 nm em relação ao clorofórmio.

6.2.2 - Amostras sólidas e cremes:

6.2.2.1 - Num balão de fundo redondo de 100 ml (5.1) pesar 0,500 g da amostra. Juntar 30 ml de benzeno (4.2) e 20 ml de ácido clorídrico 1 N (4.7). Aquecer à ebulição com refluxo durante trinta minutos, agitando.

6.2.2.2 - Transferir o conteúdo do balão para uma ampola de decantação (5.5) de 100 ml e lavar com 5 ml de ácido clorídrico 1 N (4.7). Transferir a fase aquosa para um balão de fundo redondo (5.1). Lavar a fase benzénica com 5 ml de ácido clorídrico 1 N (4.7) e recolher as águas de lavagem no balão. Prosseguir como indicado no n.º 6.2.2.4.

6.2.2.3 - Caso das emulsões que não convêm para prosseguimento da análise. Misturar 0,500 g da amostra com 2 g de celite 545 (4.14), de modo a obter um pó fluido. Colocar a mistura, em pequenas fracções, na coluna de vidro para cromatografia (5.12). Após cada adição, homogeneizar e compactar o conteúdo da coluna. Quando toda a mistura amostra-celite for introduzida na coluna, eluir com ácido clorídrico 0,1 N (4.13), de modo a obter 10 ml de eluído em cerca de dez minutos. Em caso de necessidade, pode-se proceder a esta eluição, exercendo uma ligeira pressão com azoto. Durante a eluição é conveniente assegurar-se de que há sempre ácido clorídrico acima da mistura amostra-celite.

Os primeiros 10 ml de eluído são seguidamente tratados como indicado no n.º 6.2.2.4.

6.2.2.4 - As fases aquosas (6.2.2.2) ou os eluídos (6.2.2.3) são misturados e concentrados até à secura quase total, sob pressão reduzida, no evaporador rotativo.

6.2.2.5 - Dissolver o resíduo em 6 ml da solução de hidróxido de sódio 1 N (4.9). Juntar 20 ml de licor de Fehling (4.16) e transferir para uma ampola de decantação de 50 ml (5.5). Lavar o balão com 8 ml de clorofórmio (4.3) e transferir para ampola de decantação. Após agitação, a fase clorofórmica é filtrada e recolhida num balão aferido de 50 ml (5.2).

6.2.2.6 - A fase aquosa é extraída por três vezes com 8 ml de clorofórmio (4.3). As fases clorofórmicas são filtradas e recolhidas num balão aferido de 50 ml. Completar o volume com clorofórmio e agitar. Determinar a densidade óptica da solução amarela a 410 nm em relação ao clorofórmio.

7 - Curva de calibração:

7.1 - Para balões de fundo redondo de 100 ml (5.1), contendo cada um 3 ml de uma solução aquosa de etanol a 30% (4.20), pipetar 5 ml, 10 ml, 15 ml e 20 ml da solução padrão (4.15.1) e proceder como indicado no n.º 6.2.1.

8 - Expressão dos resultados:

8.1 - Amostras líquidas:

$$\text{Percentagem (m/m) de 8-hidroxiquinoleína} = \frac{a \cdot 100}{m}$$

em que:

$a$  = número de miligramas de 8-hidroxiquinoleína extrapolados na curva de calibração (7);

$m$  (mg) = massa de amostra (6.2.2.1).

8.2 - Amostras sólidas e cremes:

$$\text{Percentagem (m/m) de 8-hidroxiquinoleína} = \frac{2a \cdot 100}{m}$$

em que:

$a$  = número de miligramas de 8-hidroxiquinoleína extrapolados na curva de calibração (7);

$m$  (mg) = massa de amostra (6.2.2.1).

9 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em 8-hidroxiquinoleína da ordem de 0,3%, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,02%.

## CAPÍTULO XVIII

### Iodato de sódio - Identificação e doseamento

Objectivo e campo de aplicação:

O método é adequado para a identificação e doseamento do iodato de sódio nos produtos cosméticos sujeitos a lavagem após utilização.

#### A - Identificação

1 - Princípio:

O iodato de sódio é separado dos outros halogenatos por cromatografia em camada fina e identificado por oxidação do iodeto em iodo.

2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

2.1 - Soluções de referência: soluções aquosas de clorato, bromato e iodato de potássio a 0,01% (m/v) preparadas recentemente.

2.2 - Eluente: solução de amoníaco a 28% (m/v), acetona e butanol (60:130:30, em volume).

2.3 - Solução aquosa de iodeto de potássio a 5% (m/v).

2.4 - Solução de amido de 1% a 5% (m/v).

2.5 - Ácido clorídrico 1 M.

3 - Aparelhagem:

3.1 - Placas de cromatografia em camada fina prontas para utilização, revestidas de celulose (0,25 mm).

3.2 - Material corrente de cromatografia em camada fina.

4 - Técnica:

4.1 - Extrair cerca de 1 g de amostra com água, filtrar e diluir a cerca de 10 ml.

4.2 - Aplicar 2 µl desta solução na linha de base da placa (3.1) e 2 µl de cada uma das três soluções de referência (2.1).

4.3 - Colocar a placa numa tina de desenvolvimento e desenvolver por cromatografia ascendente aproximadamente no percurso de três quartos do comprimento da placa com a ajuda do eluente (2.2).

4.4 - Retirar a placa da tina e deixar evaporar o eluente à temperatura ambiente.

Nota. - A operação pode demorar duas horas.

4.5 - Pulverizar a placa com iodeto de potássio (2.3) e deixar secar durante cerca de cinco minutos.

4.6 - Pulverizar seguidamente com a solução de amido (2.4) e deixar secar durante cerca de cinco minutos.

4.7 - Pulverizar finalmente com ácido clorídrico (2.5).

5 - Avaliação:

Em presença de iodato, aparece imediatamente uma mancha azul, tornando-se acastanhada, com o valor de Rf aproximadamente de 0 a 0,2. Os bromatos reagem imediatamente, apresentando valores de Rf de 0,5 a 0,6, e os cloratos reagem cerca de trinta minutos depois, apresentando valores de Rf de 0,7 a 0,8.

## B - Doseamento

1 - Definição:

O teor da amostra em iodato de sódio determinado por este método é expresso em percentagem da massa de iodato de sódio.

2 - Princípio:

O iodato de sódio é dissolvido em água e doseado por cromatografia líquida a alta pressão, utilizando (em série) uma coluna de fase reversa C 18 e uma coluna permutadora de aniões.

3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica. Devem, nomeadamente, ser apropriados para a cromatografia líquida a alta pressão.

3.1 - Ácido clorídrico 4 M.

3.2 - Solução aquosa de sulfito de sódio a 5% (m/v).

3.3 - Solução mãe de iodato de sódio: preparar uma solução contendo 50 mg de iodato de sódio por 100 ml de água.

3.4 - Di-hidrogeno-ortofosfato de potássio.

3.5 - Hidrogeno-ortofosfato dissódico 2H<sub>2</sub>O.

3.6 - Fase móvel da cromatografia líquida a alta pressão: dissolver 3,88 g de di-hidrogeno-ortofosfato de potássio (3.4) e 1,19 g de hidrogeno-ortofosfato dissódico 2H<sub>2</sub>O (3.5) em 1 l de água.

O pH da solução obtida é 6,2.

3.7 - Papel indicador universal, pH 1-11.

#### 4 - Aparelhagem:

Material corrente de laboratório.

4.1 - Papel de filtro de 110 mm de diâmetro, Schleicher e Schull n.º 5/5, ou equivalente.

4.2 - Cromatógrafo líquido a alta pressão munido de um detector com comprimento de onda variável.

4.3 - Colunas: com comprimento de 120 mm e com diâmetro interno de 4,6 mm, em número de dois, em série; primeira coluna com nucleosil (R) 5 C 18, ou equivalente, segunda coluna com Vydac, TM-301-SB, ou equivalente.

#### 5 - Técnica:

##### 5.1 - Preparação das amostras:

##### 5.1.1 - Amostras fluidas (champôs):

Pesar com precisão uma tomada de ensaio de cerca de 1,0 g em proveta graduada com rolha esmerilada ou num balão aferido de 10 ml. Completar com água e misturar. Em caso de necessidade, filtrar a solução. Determinar a quantidade de iodato na solução por meio de cromatografia líquida a alta pressão, conforme é descrito no n.º 5.2.

##### 5.1.2 - Amostras sólidas (sabão):

Dividir finamente uma parte da amostra, pesar com precisão uma tomada de ensaio de cerca de 1,0 g e introduzir em proveta graduada com rolha esmerilada de 100 ml. Encher com água até 50 ml e agitar energicamente durante um minuto; centrifugar ou filtrar por papel, ou deixar repousar a mistura durante uma noite, pelo menos; agitar energicamente a solução gelatinosa e filtrar esta por papel (4.1). Dosear o iodato no filtrado por cromatografia líquida a alta pressão, conforme é descrito no n.º 5.2.

##### 5.2 - Cromatografia:

Débito: 1 ml/min.;

Comprimento de onda do detector: 210 nm;

Volume injectado: 10 µl;

Medida: área do pico.

##### 5.3 - Calibração:

Pipetar, respectivamente, 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml e 20,0 ml da solução mãe do iodato de sódio (3.3) em balões aferidos de 50 ml. Completar o volume e agitar. As soluções assim obtidas contêm, respectivamente, 0,01 mg, 0,02 mg, 0,05 mg, 0,10 mg e 0,20 mg de iodato de sódio por mililitro. Injectar 10 µl de cada solução de referência no cromatógrafo líquido (4.2). Determinar a área do pico para o iodato e estabelecer uma curva de calibração: área do pico-concentração de iodato.

#### 6 - Cálculo:

Calcular o teor de iodato de sódio em percentagem de massa (% m/m) utilizando a fórmula:

$$\text{Percentagem de massa de iodato de sódio} = \frac{Vc}{10m}$$

em que:

$m$  = a massa, expressa em gramas, da tomada de ensaio (5.1);

$V$  = o volume total da solução de amostra, expresso em mililitros, obtido conforme é descrito no n.º 5.1;

$c$  = a concentração, expressa em miligramas/mililitros, de iodato de sódio obtido a partir da curva de calibração.

#### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em iodato de sódio de 0,1% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos efectuados em paralelo na mesma amostra não deve ultrapassar 0,002%.

#### 8 - Confirmação:

##### 8.1 - Princípio:

Em solução ácida, o iodato ( $IO_3^-$ ) é reduzido a iodeto ( $I^-$ ) pelo sulfito e a solução obtida é examinada por cromatografia líquida a alta pressão. Se um pico com um iodato desaparecer após tratamento com sulfito, o pico original pode ser considerado como o iodato.

##### 8.2 - Técnica:

Pipetar para matrás uma tomada de ensaio de 5 ml da solução da amostra obtida no n.º 5.1. Ajustar o pH da solução a um valor inferior ou igual a 3 com ácido colorídrico (3.1) e papel indicador universal de pH (3.7). Juntar três gotas da solução de sulfito sódico (3.2) e agitar. Injectar 10 µl da solução no cromatógrafo líquido (4.2).

Comparar o cromatograma com o que foi obtido da forma descrita no n.º 5 para a mesma amostra.

## CAPÍTULO XIX

### Metanol em relação ao etanol ou ao 2-propanol - Doseamento

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento do metanol por cromatografia em fase gasosa em todos os tipos de produtos cosméticos, incluindo os aerossóis. Aplica-se a concentrações relativas de 0% a 10%.

#### 2 - Definição:

O teor em metanol determinado segundo este método é expresso em percentagem de massa (m/m) de metanol em relação com a massa de etanol ou de 2-propanol.

#### 3 - Princípio:

O doseamento é efectuado por cromatografia em fase gasosa.

#### 4 - Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

##### 4.1 - Metanol.

##### 4.2 - Etanol absoluto.

##### 4.3 - 2-propanol.

##### 4.4 - Clorofórmio, lavado com água para eliminar os álcoois.

#### 5 - Aparelhagem:

5.1 - Cromatógrafo de fase gasosa com detector catarométrico (para as amostras de produtos em aerossóis).

Cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (para as amostras de outros produtos).

##### 5.2 - Balões aferidos de 100 ml.

5.3 - Pipetas aferidas de 0,1 ml, 2 ml e 20 ml.

5.4 - Microseringas de 0 µl a 100 µl e de 0 µl a 5 µl:

Somente para as amostras de produtos em aerossóis, seringa especial para gás, com válvula móvel (figura 5 do método de amostragem).

6 - Técnica:

6.1 - Preparação das amostras:

6.1.1 - Os produtos em aerossóis são tratados como indicado na 2.ª parte e depois analisados por cromatografia em fase gasosa nas condições indicadas no n.º 6.2.

6.1.2 - Os outros produtos, tratados como indicado na 2.ª parte, são diluídos em água até uma concentração de 1% a 2% de etanol ou de 2-propanol, e depois analisados por cromatografia em fase gasosa nas condições indicadas no n.º 6.2.2.

6.2 - Condições de cromatografia em fase gasosa:

6.2.1 - Para as amostras de produtos em aerossóis:

6.2.1.1 - Utilizar-se-á uma coluna cheia com 10% de Hallcomid M 18 sobre Chromosorb WAW 100-120 mesh e um detector catarométrico.

6.2.1.2 - A fase estacionária deve permitir um grau de resolução igual ou superior a 1,5:

$$R = 2 \cdot \frac{d' R_2 - d' R_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$R_1$  e  $R_2$  = tempo de retenção, expresso em minutos, de dois picos;

$W_1$  e  $W_2$  = largura dos mesmos picos a meia altura;

$d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

6.2.1.3 - As condições seguintes permitem obter bons resultados:

Tipo de coluna: aço inoxidável;

Comprimento: 3,5 m;

Diâmetro: 3 mm;

Intensidade de corrente do detector catarométrico: 150 mA;

Gás de arrastamento: hélio:

Pressão: 2,5 b;

Débito: 45 ml/min.;

Temperaturas:

Injector: 150°C;

Detector: 150°C;

Coluna: 65°C.

6.2.2 - Para as amostras de outros produtos:

6.2.2.1 - Utilizar-se-á uma coluna cheia com Chromosorb 105 ou com Porapak Qs e um detector de ionização de chama.

6.2.2.2 - A fase estacionária deve permitir um grau de resolução igual ou superior a 1,5:

$$R = 2 \cdot \frac{d'R_2 - d'R_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$R_1$  e  $R_2$  = tempo de retenção, expresso em minutos, de dois picos;  
 $W_1$  e  $W_2$  = largura dos mesmos picos a meia altura;  
 $d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

6.2.2.3 - As condições seguintes permitem obter bons resultados:

Tipo de coluna: aço inoxidável;  
 Comprimento: 2 m;  
 Diâmetro: 3 mm;  
 Electrómetro: sensibilidade de 8.10(elevado a -10) A;  
 Gás de arrastamento: azoto:

Pressão: 2,1 b;  
 Débito: 40 ml/min.;

Auxiliar: hidrogénio:

Pressão: 1,5 b;  
 Débito: 20 ml/min.;

Temperaturas:

Injector: 150°C;  
 Detector: 230°C;  
 Colunas: 120°C ou 130°C.

7 - Curvas padrão:

7.1 - Nas condições indicadas no n.º 6.2.1 (coluna Hallcomid M 18), utilizar as misturas padrão definidas seguidamente. Preparar estas misturas por medida volumétrica, mas determinar a quantidade exacta libertada, pesando imediatamente após cada adição:

Concentração relativa — Porcentagem de massa	Metanol — Mililitros	Etanol — Mililitros (ou 2-propanol)	Clorofórmio até um volume de
Aproximadamente 2,5%	0,5	20	100 ml
Aproximadamente 5,0%	1,0	20	100 ml
Aproximadamente 7,5%	1,5	20	100 ml
Aproximadamente 10,0%	2,0	20	100 ml

Injectar 2 µl a 3 µl no cromatógrafo, como foi indicado no n.º 6.2.1. Calcular a razão das áreas dos picos (metanol/etanol ou metanol/2-propanol) de cada mistura. Traçar a curva padrão utilizando:

Como eixo dos X: a percentagem de metanol em relação ao etanol ou ao 2-propanol;

Como eixo dos Y: a razão das áreas dos picos (metanol/etanol ou metanol/2-propanol).

7.2 - Nas condições indicadas no n.º 6.2.2 (Porapak Qs ou Chromosorb 105), utilizar as misturas padrão definidas seguidamente. Preparar estas misturas por medida volumétrica, mas determinar a quantidade exacta libertada, pesando imediatamente após cada adição:

Concentração relativa — Porcentagem de massa	Metanol — Microlitros	Etanol — Microlitros (ou 2-propanol)	Água até um volume de
Aproximadamente 2,5%	50	2	100 ml
Aproximadamente 5,0%	100	2	100 ml
Aproximadamente 7,5%	150	2	100 ml
Aproximadamente 10,0%	200	2	100 ml

Injectar 2 µl a 3 µl no cromatógrafo, como foi indicado no n.º 6.2.2. Calcular a razão das áreas dos picos (metanol/etanol ou metanol/2-propanol) de cada mistura. Traçar a curva padrão utilizando:

Como eixo dos X: a percentagem de metanol em relação ao etanol ou ao 2-propanol;

Como eixo dos Y: a razão das áreas dos picos (metanol/etanol ou metanol/2-propanol).

7.3 - Nos dois casos a curva de calibração deve ser uma recta.

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para teores em metanol de 5% em relação ao etanol ou ao 2-propanol, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,25%.

## CAPÍTULO XX

### Nitritos - Identificação e doseamento

#### A - Identificação

1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método destina-se à identificação dos nitritos nos produtos cosméticos. Aplica-se, em particular, aos cremes, aos produtos pastosos e aos dentífrícios.

2 - Princípio:

A caracterização dos nitritos faz-se com fenil-hidrazona-2-aminobenzaldeído.

3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Ácido sulfúrico diluído: diluir 2 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,84$ ) em 11 ml de água destilada.

3.2 - Ácido clorídrico diluído: diluir 1 ml de ácido clorídrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,19$ ) em 11 ml de água destilada.

3.3 - Metanol.

3.4 - Solução de fenil-hidrazona-2-aminobenzaldeído (reagente Nitrine R) em metanol.

Pesar 2 g de Nitrine R e introduzi-los em balão aferido de 100 ml. Juntar, gota a gota, 4 ml de ácido clorídrico diluído (3.2) e agitar. Completar o volume com metanol e misturar até que a solução esteja completamente límpida. Conservar a solução num frasco de vidro castanho (4.3).

4 - Material:

4.1 - Copos de 50 ml.

4.2 - Balão aferido de 100 ml.

4.3 - Frasco de vidro castanho de 125 ml.

4.4 - Placa de vidro de 10 cm x 10 cm.

4.5 - Espátula de material sintético.

4.6 - Papel de filtro de 10 cm x 10 cm.

5 - Técnica:

5.1 - Estender uniformemente uma parte da amostra a examinar sobre a placa de vidro (4.4), procurando que a espessura da camada não ultrapasse 1 cm.

5.2 - Mergulhar uma folha de papel de filtro (4.6) em água destilada e colocá-la sobre a amostra, aplicando-a convenientemente com a ajuda da espátula (4.5).

5.3 - Esperar cerca de um minuto e colocar no meio do papel de filtro:

Duas gotas de ácido sulfúrico diluído (3.1); e seguidamente

Duas gotas da solução de Nitrine R (3.4).

5.4 - Passados cinco a dez segundos, retirar o papel de filtro e examiná-lo à luz do dia. Uma coloração vermelho-violeta indica a presença de nitritos. Quando o teor em nitritos é pouco elevado, a coloração violeta passa para amarela em cinco a quinze segundos. Esta viragem não se verifica senão passados um a dois minutos em presença de quantidades significativas de nitritos.

6 - Nota. - A intensidade da coloração violeta, bem como a duração da passagem para o amarelo, pode dar uma indicação do teor em nitritos da amostra.

## B - Doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método indicado seguidamente é adaptado ao doseamento dos nitritos nos produtos cosméticos.

2 - Definição:

O teor da amostra em nitritos determinado por este método é expresso em percentagem de massa (m/m) de nitrito de sódio.

3 - Princípio:

Após diluição e clarificação da amostra, efectua-se uma reacção colorimétrica com a N-( $\alpha$ -naftilo-etilenodiamina) e a intensidade da coloração obtida é determinada a 538 nm.

#### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Reagentes de clarificação (estes reagentes não podem ser utilizados mais de uma semana após a sua preparação):

##### 4.1.1 - Reagente I (Carrez I):

Dissolver 106 g de ferrocianeto de potássio  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  em água destilada e completar a 1000 ml.

##### 4.1.2 - Reagente II (Carrez II):

Dissolver 219,5 g de acetato de zinco  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  e 30 ml de ácido acético glacial em água destilada e completar a 1000 ml.

##### 4.2 - Solução de nitrito de sódio:

Num balão aferido de 1000 ml dissolver 0,500 g de nitrito de sódio em água destilada e completar o volume. Diluir 10,0 ml desta solução mãe a 500 ml. 1 ml desta última solução = 10  $\mu$ g de  $NaNO_2$ .

##### 4.3 - Solução de hidróxido de sódio 1 N.

##### 4.4 - Solução a 0,2% de cloridrato de sulfanilamida:

Dissolver 2 g de sulfanilamida em 800 ml de água quente. Arrefecer e juntar 100 ml de HCl concentrado, agitando. Completar a 1000 ml.

##### 4.5 - Ácido clorídrico 5 N.

##### 4.6 - Reagente de N-( $\alpha$ -naftilo):

Dissolver 0,1 g de dicloridrato de N-( $\alpha$ -naftilo-etilenodiamina) em água e completar a 100 ml. É preparado no próprio dia de utilização.

#### 5 - Aparelhagem:

5.1 - Balança analítica.

5.2 - Balões aferidos de 100 ml, 250 ml, 500 ml e 1000 ml.

5.3 - Pipetas aferidas.

5.4 - Provetas de 100 ml.

5.5 - Filtro de pregas isento de nitritos, de 15 cm de diâmetro.

5.6 - Banho-maria.

5.7 - Espectrofotómetro com tinas de 1 cm de percurso óptico.

5.8 - Potenciómetro.

5.9 - Microbureta de 10 ml.

5.10 - Copo de 50 ml.

#### 6 - Técnica:

6.1 - Pesar, com uma precisão de cerca de 0,1 mg, cerca de 0,5 g (m) de amostra homogeneizada e introduzi-los num copo de 250 ml. Diluir até um volume de cerca de 150 ml com água destilada quente. Colocar o copo, durante meia hora, num banho-maria a 80°C, agitando de vez em quando.

6.2 - Arrefecer à temperatura ambiente e juntar sucessivamente, agitando sempre, 2 ml do reagente de Carrez I (4.1.1) e 2 ml do reagente de Carrez II (4.1.2).

6.3 - Ajustar o pH a 8,3 no potenciómetro com uma solução de hidróxido de sódio 1 N. Transferir quantitativamente para um balão aferido de 250 ml e completar o volume com água destilada.

6.4 - Misturar e filtrar por filtro de pregas (5.5).

6.5 - Pipetar uma quantidade conveniente ( $V$  ml) do filtrado límpido, não ultrapassando 25 ml, para um balão aferido de 100 ml e diluir com água destilada até 60 ml.

6.6 - Misturar, adicionar 10,0 ml de cloridrato de sulfanilamida (4.4) e depois 6,0 ml de ácido clorídrico 5 N (4.5). Misturar e deixar repousar durante cinco minutos. Juntar 2,0 ml do reagente N-( $\alpha$ -naftilo) (4.6), misturar e deixar repousar durante três minutos. Completar a 100 ml e misturar.

6.7 - Preparar um ensaio em branco, repetindo as operações efectuadas nos n.os 6.5 e 6.6 sem adição do reagente N-( $\alpha$ -naftilo) (4.6).

6.8 - Determinar (5.7) a densidade óptica a 538 nm da solução da amostra (6.6) em relação à solução correspondente ao ensaio em branco (6.7).

6.9 - Ler na curva de calibração (6.10) o teor em nitrito de sódio, em microgramas por 100 ml de solução ( $m_1$ ), correspondente à densidade óptica determinada para a amostra (6.8).

6.10 - Curva de calibração. Preparar com a solução de nitrito de sódio (4.2) uma curva de calibração na gama de 0  $\mu$ g-20  $\mu$ g-40  $\mu$ g-60  $\mu$ g- 80  $\mu$ g-100  $\mu$ g de nitrito de sódio por 100 ml.

#### 7 - Cálculo:

Calcular o teor da amostra em nitrito de sódio, em percentagem de massa (m/m), pela fórmula seguinte:

$$\text{Percentagem de massa (m/m), de nitrito de sódio} = \frac{250}{V} \cdot m_1 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{100}{m} = \frac{m_1}{V \cdot m \cdot 40}$$

em que:

$m$  = massa, em gramas, da amostra submetida a análise (6.1);

$m_1$  = teor de nitrito de sódio em microgramas, determinado segundo as indicações do n.º 6.9;

$V$  = mililitros de filtrado utilizados no n.º 6.5.

#### 8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de nitrito de sódio de 0,2%, a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,005%.

## CAPÍTULO XXI

### Nitrometano - Identificação e doseamento

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método é aplicável à identificação e ao doseamento do nitrometano nos produtos cosméticos acondicionados sob forma de aerossol, para uma concentração inferior ou igual a 0,3%.

#### 2 - Definição:

O teor da amostra em nitrometano determinado por este método é expresso em percentagem de massa (m/m) de nitrometano na totalidade do conteúdo de aerossol.

#### 3 - Princípio:

O nitrometano é identificado por reacção corada. O seu doseamento é efectuado por cromatografia em fase gasosa, após adição de um padrão interno.

#### 4 - Identificação:

##### 4.1 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

##### 4.1.1 - Solução de hidróxido de sódio 0,5 N.

##### 4.1.2 - Reagente de Folin:

Dissolver em água 0,1 g de sal sódico do ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico e completar a 100 ml.

##### 4.2 - Técnica:

Juntar 10 ml da solução do n.º 4.1.1 e 1 ml do reagente do n.º 4.1.2 a 1 ml de amostra. Uma coloração violeta indica a presença de nitrometano.

#### 5 - Doseamento:

##### 5.1 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

##### 5.1.1 - Clorofórmio (padrão interno 1).

##### 5.1.2 - 2,4-dimetil-heptano (padrão interno 2).

##### 5.1.3 - Etanol a 95%.

##### 5.1.4 - Nitrometano.

##### 5.1.5 - Solução padrão em clorofórmio:

Num balão aferido de 25 ml previamente tarado introduzir cerca de 650 mg de clorofórmio (5.1.1). Pesar de novo com cuidado o balão e o seu conteúdo. Completar o volume com etanol a 95% (5.1.3). Pesar e calcular a percentagem em massa de clorofórmio nesta solução.

##### 5.1.6 - Solução padrão com dimetil-heptano:

Proceder como para a solução padrão em clorofórmio, mas introduzir 270 mg de 2,4-dimetil-heptano (5.1.2) num balão aferido de 25 ml.

##### 5.2 - Aparelhagem:

##### 5.2.1 - Cromatógrafo de fase gasosa, com detector de ionização de chama.

5.2.2 - Aparelhagem para a amostragem dos aerossóis (frasco de transferência, microseringa, ligação, etc.), tal como é descrita na 2.ª parte.

##### 5.2.3 - Material corrente de laboratório.

##### 5.3 - Técnica:

##### 5.3.1 - Preparação da amostra:

Num frasco de transferência de 100 ml previamente tarado e liberto de ar (segundo a técnica descrita no n.º 5.4 da 2.ª parte) no qual se fez vácuo introduzir cerca de 5 ml de um ou outro dos padrões internos 5.1.5 ou 5.1.6.

Utilizar uma seringa de vidro de 10 ml ou 20 ml sem agulha, adaptada ao dispositivo de recolha, segundo a técnica descrita no n.º 5 da 2.ª parte. Segundo a mesma técnica, introduzir no frasco cerca de 50 g do conteúdo da amostra de aerossol. Pesar de novo, a fim de determinar a quantidade da amostra introduzida. Misturar cuidadosamente. Injectar cerca de 10 ml, utilizando a microseringa (5.2.2). Efectuar cinco injecções.

##### 5.3.2 - Preparação do padrão:

Num balão aferido de 50 ml pesar com precisão cerca de 500 mg de nitrometano (5.1.4) em 500 mg de clorofórmio (5.1.1) ou 210 mg de 2,4-dimetil-heptano (5.1.2). Completar o volume com etanol a 95% (5.1.3).

Misturar cuidadosamente. Introduzir 5 ml desta solução num balão aferido de 20 ml e completar o volume com etanol a 95% (5.1.3). Injectar cerca de 10 ml, utilizando a microseringa (5.2.2). Efectuar cinco injeções.

5.3.3 - Condições de cromatografia em fase gasosa:

5.3.3.1 - Coluna:

Trata-se de uma coluna constituída por duas partes, a primeira contendo dodecilftalato em Gaschrome Q, como fase estacionária, a segunda Ucon 50 HB 280 X em Gaschrome Q, como fase estacionária. A coluna dupla assim preparada deve dar uma resolução R igual ou superior a 1,5, partindo do princípio de que:

$$R = 2 \cdot \frac{d'r_2 - d'r_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$r_1$  e  $r_2$  = tempo de retenção, em minutos;

$W_1$  e  $W_2$  = largura dos picos a meia altura, em milímetros;

$d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

A título de exemplo, são dadas as seguintes condições:

Parte A:

Coluna: aço inoxidável;

Comprimento: 1,5 m;

Diâmetro: 3 mm;

Enchimento: 20% de dodecilftalato em Gaschrome Q 100-120 mesh;

Parte B:

Coluna: aço inoxidável;

Comprimento: 1,5 m;

Diâmetro: 3 mm;

Enchimento: 20% de Ucon 50 HB 280 X em Gaschrome Q 100-120 mesh.

5.3.3.2 - Detector:

Ionização de chama. O electrómetro do detector deve ser regulado para uma sensibilidade de  $8 \times 10^{-10}$  A.

5.3.3.3 - Temperaturas:

Injector: 150°C;

Detector: 150°C;

Coluna: entre 50°C e 80°C, segundo o tipo de coluna e a aparelhagem.

5.3.3.4 - Gás:

Gás de arrastamento: azoto;

Pressão: 2,1 b;  
Débito: 40 ml/min.;  
Detector: gás recomendado pelo fabricante.

## 6 - Cálculos:

6.1 - Factor de resposta do nitrometano, calculado em referência ao padrão interno utilizado.

Se n representa o nitrometano:

$k_n$  = o factor de resposta;  
 $m'_n$  = a sua massa, em gramas, na mistura;  
 $S'_n$  = a área do seu pico;

e se C representa o padrão interno, clorofórmio ou 2,4-dimetil-heptano:

$m'_c$  = a sua massa, em gramas, na mistura;  
 $S'_c$  = a área do seu pico.

A fórmula será:

$$K_n = \frac{m'_n \cdot S'_c}{m'_c \cdot S'_n}$$

$k_n$  depende da aparelhagem.

6.2 - Concentração do nitrometano na amostra:

Se n representa o nitrometano:

$k_n$  = o factor de resposta;  
 $S_n$  = a área do seu pico;

e se C representa o padrão interno, clorofórmio ou 2,4-dimetil-heptano:

$m_c$  = a massa, em gramas, na mistura;  
 $S_c$  = a área do seu pico;

e se c representa o padrão interno, clorofórmio ou 2,4-dimetil-heptano:

$m_c$  = a massa, em gramas, na mistura;  
 $S_c$  = a área do seu pico;  
 $M_c$  = a massa, em gramas, da amostra de aerossol transferida.

A percentagem (m/m) de nitrometano na amostra será igual a:

$$\frac{m_{cn} \cdot K_n \cdot S_n}{M \cdot S_c} \cdot 100$$

7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em nitrometano da ordem de 0,3% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,03%.

## CAPÍTULO XXII

### Quinina - Identificação e doseamento

#### A - Identificação

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método é destinado a pôr em evidência a presença de quinina nos champôs e loções capilares.

##### 2 - Princípio:

A identificação efectua-se por cromatografia em camada fina de gele de sílica e é revelado pela fluorescência azul da quinina em meio ácido a 360 nm. Para posterior confirmação, pode-se anular esta fluorescência por meio de vapores de bromo e fazer segunda revelação pelos vapores de amoníaco, fazendo aparecer uma fluorescência amarelada.

##### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Placas de gele de sílica com espessura de 0,25 mm sem indicador de fluorescência, formato 20 cm x 20 cm.

3.2 - Eluente: tolueno, éter, diclorometano e dietilamina (20:20:20:8, em volume).

3.3 - Metanol.

3.4 - Ácido sulfúrico a 96% ( $d_4^{20} = 1,84$ )

3.5 - Éter:

3.6 - Revelador: juntar cuidadosamente 5 ml de ácido sulfúrico (3.4) a 95 ml de éter (3.5) num recipiente refrigerado.

3.7 - Bromo.

3.8 - Amónia a 28% ( $d_4^{20} = 1,84$ )

3.9 - Quinina anidra.

3.10 - Solução padrão: pesar com precisão cerca de 100 mg de quinina anidra (3.9) e dissolvê-los em metanol (3.3) num balão aferido de 100 ml.

##### 4 - Aparelhagem:

4.1 - Equipamento corrente de cromatografia em camada fina.

4.2 - Banho de ultra-sons.

4.3 - Filtros Millipore FH 0,5  $\mu\text{m}$ , ou equivalente, com aparelhagem de filtração adequada.

##### 5 - Técnica:

###### 5.1 - Preparação da amostra:

Pesar com precisão uma quantidade de produto cosmético susceptível de conter cerca de 100 mg de quinina. Introduzi-la num balão aferido de 100 ml, dissolver e completar o volume com metanol (3.3). Tapar e deixar durante uma hora à temperatura ambiente no banho de ultra-sons (4.2). Filtrar por membrana (4.3) e utilizar este filtrado para a cromatografia.

## 5.2 - Cromatografia em camada fina.

Aplicar sobre a placa de gele de sílica (3.1) 1,0 µl de solução padrão (3.10) e 1,0 µl de solução da amostra 5.1. Desenvolver o cromatograma no percurso de 15 cm, numa tina previamente saturada pelos vapores do eluente (3.2).

### 5.3 - Revelação:

5.3.1 - Secar a placa à temperatura ambiente.

5.3.2 - Pulverizar com reagente (3.6).

5.3.3 - Deixar secar a placa durante uma hora à temperatura ambiente.

5.3.4 - Observar a placa sob radiação ultravioleta a 360 nm. A quinina aparece sob a forma de uma mancha fluorescente azul intensa. A título de exemplo, o quadro seguinte reproduz os valores de Rf dos principais alcalóides da quina, usando o mesmo eluente (3.2):

Alcalóides	Rf
Quinina.....	0,20
Quinidina.....	0,29
Cinchonina.....	0,33
Cinchonidina.....	0,27
Hidroquinina.....	0,17

5.3.5 - Para posterior confirmação da identificação da quinina, expõe-se durante cerca de uma hora a placa aos vapores de bromo (3.7); a fluorescência desaparece. Expondo seguidamente a mesma placa aos vapores de amoníaco (3.8), as manchas reaparecem com uma coloração castanha e, observando a placa sob raios ultravioletas a 360 nm, constata-se uma fluorescência amarelada. Limite de identificação: 0,1 µg de quinina.

## B - Doseamento

### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento da quinina nos champôs e nas loções capilares. É o adequado para dosear, no máximo, 0,5% (m/m) nos champôs e 0,2% (m/m) nas loções.

### 2 - Definição:

O teor em quinina avaliado por este método é expresso em percentagem de massa (m/m) do produto.

### 3 - Princípio:

Após tratamento adequado do produto a analisar, o doseamento é efectuado por cromatografia líquida a alta pressão (HPLC).

### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica. Devem, nomeadamente, ser adequados para a cromatografia líquida a alta pressão.

4.1 - Acetonitrilo.

4.2 - Di-hidrogeno-ortofosfato de potássio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

4.3 - Ácido ortofosfórico a 85% ( $d_4^{20} = 1,7$ )

4.4 - Brometo de tetrametilamónio.

4.5 - Quinina anidra.

4.6 - Metanol.

4.7 - Solução de ácido ortofosfórico 0,1 M: dissolver 11,53 g de ácido ortofosfórico (4.3) em 1000 ml de água destilada num balão aferido.

4.8 - Solução de di-hidrogeno-ortofosfato de potássio 0,1 M: dissolver 13,6 g de di-hidrogeno-ortofosfato de potássio (4.2) em 1000 ml de água destilada num balão aferido.

4.9 - Solução de brometo de tetrametilamónio 0,1 M: dissolver 15,40 g de brometo de tetrametilamónio (4.4) em 1000 ml de água destilada num balão aferido.

4.10 - Eluente: ácido ortofosfórico 0,1 M (4.7), di-hidrogeno-ortofosfato de potássio 0,1 M (4.8), brometo de tetrametilamónio 0,1 M (4.9), água para HPLC e acetonitrilo (4.1) (10:50:100:340:90, em volume).

A composição da fase móvel pode ser modificada de tal maneira que o factor de resolução R seja igual ou superior a 1,5:

$$R = 2 \cdot \frac{d' R_2 - d' R_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$R_1$  e  $R_2$  = tempo de retenção, expresso em minutos, de dois picos consecutivos;  
 $W_1$  e  $W_2$  = largura dos picos a meia altura, expressa em milímetros;  
 $d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

4.11 - Sílica octadecilsilanizada de granulometria 10 µm.

4.12 - Soluções padrão: numa série de balões aferidos de 100 ml, pesar sucessivamente, com precisão, 5,0 mg, 10,0 mg, 15,0 mg e 20,0 mg de quinina anidra (4.5). Completar o volume com metanol (4.6) e agitar até dissolução. Filtrar cada solução por filtro (5.5) de 0,5 µm.

5 - Aparelhagem:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Banho de ultra-sons.

5.3 - Cromatógrafo em fase líquida a alta pressão com detector de ultravioleta com comprimento de onda variável.

5.4 - Coluna em ácido inoxidável: comprimento: 25 cm; diâmetro interior: 4,6 mm; enchimento: sílica octadecilsilanizada (4.11).

5.5 - Filtro Millipore FH 0,5 µm, ou equivalente, com dispositivo de filtração apropriado.

6 - Técnica:

6.1 - Preparação da amostra:

Pesar com precisão num balão aferido de 100 ml uma quantidade de amostra correspondente a cerca de 10 mg de quinina anidra. Juntar 20 ml de metanol (4.6) e colocar o balão durante vinte minutos num banho de ultra-sons (5.2). Completar o volume com metanol (4.6). Homogeneizar a solução e filtrar uma parte alíquota por membrana (5.5).

6.2 - Condições da cromatografia:

Débito da fase móvel (4.10): 1,0 ml/min.;

Detecção: 332 nm;

Quantidade a injectar: 10,0 µl da solução filtrada (6.1);

Medição da área do pico.

#### 6.3 - Curva de calibração:

Introduzir pelo menos três vezes 10,0 µl de cada uma das soluções padrão (4.12). Medir a área do pico e calcular o seu valor médio para cada concentração. Traçar a curva de calibração.

#### 7 - Cálculo:

7.1 - A partir da curva de calibração (6.3), calcular a quantidade de quinina anidra, expressa em microgramas, contida no volume injectado.

7.2 - A concentração em quinina anidra na amostra, em percentagem de massa, é obtida pela fórmula seguinte:

$$\text{Percentagem (m/m) de quinina anidra} = \frac{B}{A}$$

em que:

$B$  = quantidade, em microgramas, de quinina anidra contida em 10 µl da solução filtrada (6.1);

$A$  = massa da amostra 6.1, expressa em gramas.

#### 8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em quinina anidra da ordem de 0,5% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ser superior a 0,02%.

Para um teor em quinina anidra da ordem de 0,2% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ser superior a 0,01%.

## CAPÍTULO XXIII

### **Resorcina nos champôs e nas loções capilares Doseamento**

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento da resorcina nos champôs e loções capilares por cromatografia em fase gasosa.

Aplica-se a concentrações de 0,1% a 2,0% (m/m) do produto.

#### 2 - Definição:

O teor em resorcina determinado por este método é expresso em percentagem da massa de resorcinol.

#### 3 - Princípio:

A resorcina e o 3,5-di-hidroxitolueno, utilizado como padrão interno, são isolados da amostra por cromatografia em camada fina. Isolam-se os dois compostos destacando o suporte e extraindo com metanol. Os resíduos são em seguida secos, sinalizados e doseados por cromatografia em fase gasosa.

#### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica:

4.1 - Ácido clorídrico a 25% (m/m).

4.2 - Metanol.

4.3 - Etanol a 96% (v/v).

4.4 - Placas de sílica em suporte plástico ou de alumínio, com indicador fluorescente, pré-preparadas e desactivadas.

Proceder da forma seguinte: vaporizar com água as placas de sílica até que se tornem brilhantes. Secá-las à temperatura ambiente durante uma a três horas.

Nota. - Se as placas não forem desactivadas, pode haver perdas de resorcina por adsorção irreversível sobre a sílica.

4.5 - Eluente: acetona, clorofórmio e ácido acético (20:75:5, em volume).

4.6 - Solução padrão de resorcina: dissolver 400 mg de resorcina em 100 ml de etanol a 96% (1 ml corresponde a 4000 µg de resorcina).

4.7 - Solução padrão interno: dissolver 400 mg de 3,5-di-hidroxitolueno (DHT) em 100 ml de etanol a 96% (1 ml corresponde a 4000 µg de DHT).

4.8 - Mistura padrão: misturar 10 ml de solução do n.º 4.6 e 10 ml de solução do n.º 4.7 num balão aferido de 100 ml, completar o volume com etanol a 96% e misturar (1 ml corresponde a 400 µg de resorcina e 400 µg de DHT).

4.9 - Reagentes de sinalização:

4.9.1 - N-O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA).

4.9.2 - Hexametildisilazano (HMDS).

4.9.3 - Trimetilclorosilano (TMCS).

5 - Aparelhagem:

5.1 - Equipamento corrente de cromatografia em camada fina e em fase gasosa.

5.2 - Material de vidro de laboratório.

6 - Técnica:

6.1 - Preparação da amostra:

6.1.1 - Pesar com precisão, num copo de 150 ml, uma tomada de ensaio do produto (m gramas) contendo cerca de 20 mg a 50 mg de resorcina.

6.1.2 - Acidificar com ácido clorídrico (4.1) (cerca de 2 ml a 4 ml). Juntar 10 ml (40 mg de DHT) de padrão interno (4.7) e misturar. Transferir para um balão aferido de 100 ml com a ajuda de etanol. Completar o volume com etanol (4.3) e misturar.

6.1.3 - Aplicar 250 µl da solução do n.º 6.1.2 numa placa de sílica desactivada (4.4), sobre uma linha contínua com cerca de 8 cm de comprimento. Tomar cuidado para obter uma banda tão estreita quanto possível.

6.1.4 - Colocar, separadamente e da mesma maneira (6.1.3), na mesma placa, 250 µl de mistura padrão (4.8).

6.1.5 - Sobre a linha de partida, aplicar duas gotas de 5 µl de cada solução dos n.os 4.6 e 4.7 para facilitar a localização após o desenvolvimento da placa.

6.1.6 - Numa tina não saturada, desenvolver a placa com o eluente (4.5) até que tenha percorrido 12 cm depois da linha de partida (quarenta e cinco minutos). Secar a placa ao ar e localizar a zona resorcina/DHT com luz UV de 254 nm. Os dois compostos têm aproximadamente o mesmo valor de R<sub>f</sub>. Destacar as bandas assim marcadas e juntar o adsorvente de cada uma num matrás de 10 ml.

6.1.7 - Extrair o adsorvente que contém a amostra e o que contém a mistura padrão da seguinte maneira: juntar 2 ml de metanol (4.2) e extrair durante uma hora, agitando continuamente. Filtrar a mistura e repetir a extracção, durante quinze minutos, com 2 ml de metanol (4.2).

6.1.8 - Evaporar o solvente da totalidade dos extractos, colocando-os durante uma noite num exsiccador, a pressão reduzida, com um exsicante adequado. Não evaporar com calor.

6.1.9 - Sinalizar os resíduos (6.1.8) como indicado no n.º 6.1.9.1 ou no n.º 6.1.9.2.

6.1.9.1 - Juntar 200 µl de BSTFA (4.9.1) e deixar a mistura num recipiente fechado à temperatura ambiente durante doze horas.

6.1.9.2 - Juntar sucessivamente 200 µl de HMDS (4.9.2) e 100 µl de TMCS (4.9.3) e aquecer a mistura durante trinta minutos a 60°C num recipiente fechado. Arrefecer.

6.2 - Cromatografia em fase gasosa:

6.2.1 - Condições operatórias:

A fase estacionária deve permitir um grau de resolução igual ou superior a 1,5:

$$R = 2 \cdot \frac{d' R_2 - d' R_1}{W_1 + W_2}$$

em que:

$R_1$  e  $R_2$  = tempo de retenção, expresso em minutos, de dois picos;

$W_1$  e  $W_2$  = largura dos mesmos picos a meia altura;

$d'$  = velocidade do papel em milímetros/minuto.

As condições operatórias seguintes permitem obter este resultado:

Coluna: aço inoxidável;

Comprimento: 200 cm;

Diâmetro: 3 mm;

Enchimento: 10% OV 17 em Chromosorb WAW 100-120 mesh;

Detector de ionização de chama;

Temperaturas:

Coluna: 185°C (isotérmica);

Injector: 250°C;

Detector: 250°C;

Gás de arrastamento: azoto;

Débito: 45 ml/min.

Para a regulação do débito de hidrogénio e do ar seguir as instruções do fabricante.

6.2.2 - Injectar 1 µl a 3 µl das soluções obtidas no n.º 6.1.9. Fazer cinco injeções para cada solução. Medir a área dos picos de modo preciso e calcular a relação das áreas:

$S$  = área do pico de resorcina/área do pico do DHT.

7 - Cálculo:

A concentração da amostra em resorcina expressa em percentagem (% m/m) é dada por:

$$\text{Percentagem (m/m) de resorcina} = \frac{4}{M} \cdot \frac{S_{\text{amostra}}}{S_{\text{mistura padrão}}}$$

em que:

$M$  = tomada de ensaio, em gramas (6.1.1);

$S_{\text{amostra}}$  = razão média obtida para os picos da solução amostra;

$S_{\text{mistura padrão}}$  = razão média obtida para os picos da mistura padrão segundo o n.º 6.2.2.

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para o teor em resorcina de 0,5% a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos realizados com a mesma amostra não deve ultrapassar 0,025%.

## CAPÍTULO XXIV

### Sulfitos e hidrogenossulfitos inorgânicos

#### Identificação e doseamento

Objectivo e campo de aplicação:

O método descreve a identificação e o doseamento dos sulfitos e dos hidrogenossulfitos inorgânicos nos produtos cosméticos. É aplicável somente aos produtos que contêm uma fase aquosa ou alcoólica e para teores até 0,2% expressos em  $\text{SO}_2$ .

#### A - Identificação

1 - Princípio:

A amostra é aquecida com ácido clorídrico e o anidrido sulfuroso libertado é identificado pelo seu cheiro ou com o auxílio de um papel indicador.

2 - Reagentes:

2.1 - Ácido clorídrico (4 M).

2.2 - Papel indicador com iodato de potássio-amido, ou outro papel indicador.

3 - Aparelhagem:

3.1 - Material corrente de laboratório.

3.2 - Balão de 25 ml provido de um refrigerante de refluxo, curto.

4 - Técnica:

4.1 - Introduzir no balão (3.2) 2,5 g de amostra e 10 ml de ácido clorídrico (2.1).

4.2 - Misturar e aquecer até à ebulição.

4.3 - Detectar o anidrido sulfuroso pelo cheiro ou por meio do papel indicador (2.2).

## B - Doseamento

### 1 - Definição:

O teor da amostra em sulfito, ou em hidrogenossulfito, determinado por este método é expresso em percentagem de massa de dióxido de enxofre.

### 2 - Princípio:

Após acidificação da amostra, o dióxido de enxofre libertado é destilado e recolhido numa solução de peróxido de hidrogénio. O ácido sulfúrico formado é doseado com auxílio de uma solução titulada de hidróxido de sódio.

### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1 - Peróxido de hidrogénio a 0,2% (m/v). Este reagente deve ser preparado diariamente.

3.2 - Ácido ortofosfórico ( $d_4^{25} = 1,75$ )

3.3 - Metanol.

3.4 - Solução titulada de hidróxido de sódio: 0,01 M.

3.5 - Azoto.

3.6 - Indicador: mistura 1:1 (v/v) de vermelho de metilo (0,03% m/v em etanol) e de azul de metileno (0,05% m/v em etanol). Filtrar a solução.

### 4 - Aparelhagem:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Aparelho de destilação (v. esquema).

### 5 - Técnica:

5.1 - Pesar com precisão cerca de 2,5 g de amostra e introduzi-los no balão de destilação A (v. esquema).

5.2 - Juntar 60 ml de água a 50 ml de metanol (3.3) e misturar.

5.3 - Introduzir 10 ml de peróxido de hidrogénio (3.1), 60 ml de água e algumas gotas de indicador (3.6) no recipiente D, destinado a receber o destilado (v. esquema). Juntar algumas gotas de hidróxido de sódio (3.4), até que o indicador vire para verde.

5.4 - Proceder da mesma maneira no frasco lavador E (v. esquema).

5.5 - Ligar o aparelho e regular o débito de azoto (3.5) para cerca de 60 bolhas por minuto.

5.6 - Introduzir pelo funil 15 ml de ácido ortofosfórico (3.2) no frasco de destilação A.

5.7 - Aquecer rapidamente à ebulição e deixar ferver regularmente durante trinta minutos.



## 2 - Definição:

O teor da amostra em sulfureto determinado segundo este método é expresso em percentagem de massa (m/m) de enxofre.

## 3 - Princípio:

Após acidificação do meio, o sulfureto de hidrogénio formado é arrastado por uma corrente de azoto e seguidamente fixado sob a forma de sulfureto de cádmio. Este, após filtração e lavagem, é doseado por iodometria.

## 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_4^{20} = 1,19$ )

4.2 - Solução titulada de tiosulfato de sódio 0,1 N.

4.3 - Soluções de iodo 0,1 N.

4.4 - Sulfureto dissódico.

4.5 - Di(acetato) de cádmio.

4.6 - Amónia concentrada ( $d_4^{20} = 0,90$ )

4.7 - Solução amoniacal de di(acetato) de cádmio: dissolver 10 g de di(acetato) de cádmio (4.5) em cerca de 50 ml de água, juntar amónia (4.6) até à redissolução do precipitado (cerca de 20 ml) e completar a 100 ml com água.

4.8 - Azoto.

4.9 - Solução de amoníaco 1 M.

## 5 - Aparelhagem:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Balão de 100 ml com três tubuladuras esmeriladas normalizadas.

5.3 - Dois matrases de 150 ml, com rolha esmerilada, munidos de um dispositivo que comporta um tubo mergulhador e uma tubuladura lateral para a libertação do gás de arrastamento.

5.4 - Funil de tubo comprido.

## 6 - Técnica:

6.1 - Arrastamento dos sulfuretos:

6.1.1 - Escolher uma embalagem que não tenha sido aberta. Pesar com exactidão no balão (5.2) uma quantidade de produto correspondente, no máximo, a 30 mg de iões de sulfureto. Introduzir 60 ml de água e duas gotas de líquido antiespuma.

6.1.2 - Em cada um dos dois matrases (5.3), introduzir 50 ml da solução 4.7.

6.1.3 - Adaptar ao balão (5.2) uma ampola de decantação, o tubo mergulhador e o tubo de libertação de gases (5.3). Ligar, com a ajuda de um tubo de PVC, o tubo de libertação aos dois matrases colocados em série (5.3).

*Nota.* - Verificar a impermeabilidade da montagem do modo seguinte: nas condições do ensaio, substituir o produto a dosear por 10 ml de uma solução de sulfureto preparada a partir do n.º 4.4 contendo x mg de sulfureto (determinado por iodometria). Seja y o número de miligramas de sulfureto encontrado no fim do ensaio. O desvio entre estas duas quantidades, x e y, não deve ser superior a 3%.

6.1.4 - Fazer passar o azoto (4.8) a um débito de duas bolhas por segundo durante quinze minutos, para expulsar o ar contido no balão (5.2).

6.1.5 - Aquecer o balão a  $85^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .

6.1.6 - Suspender a corrente de azoto e juntar, gota a gota, 40 ml de ácido clorídrico (4.1).

6.1.7 - Restabelecer a corrente de azoto (4.8) quando a quase totalidade do ácido se espalhou, deixando na ampola um mínimo de solução, para evitar as fugas de sulfureto de hidrogénio.

6.1.8 - Suspender o aquecimento passados trinta minutos e deixar arrefecer o balão (5.2), continuando a fazer passar a corrente de azoto (4.8) durante, pelo menos, uma hora e trinta minutos.

6.2 - Titulação:

6.2.1 - Filtrar o sulfureto de cádmio por filtro colocado num funil de tubo comprido (5.4).

6.2.2 - Lavar os matrasses (5.3) em primeiro lugar com uma solução amoniacal 1 M (4.9) e deitá-la sobre o filtro; lavar seguidamente com água e utilizar esta água para lavar o precipitado retido sobre o filtro.

6.2.3 - Terminar a lavagem do precipitado com 100 ml de água.

6.2.4 - Colocar o filtro de papel no primeiro matrás que conteve o precipitado. Juntar 25 ml ( $n_1$ ) da solução de iodo 0,1 N (4.3), cerca de 20 ml de ácido clorídrico (4.1) e 50 ml de água.

6.2.5 - Dosear o iodo em excesso com a solução titulada de tiosulfato de sódio 0,1 N (4.2). Seja  $n_1$  o número de mililitros utilizado.

7 - Cálculo:

O teor de sulfuretos da amostra expresso em percentagem de massa de enxofre (m/m) é calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{Percentagem (m/m) de enxofre} = \frac{(n_1 \cdot x_1 - n_2 \cdot x_2)}{20m}$$

em que:

$n_1$  = número de mililitros da solução titulada de iodo utilizado (4.3);

$x_1$  = normalidade desta solução;

$n_2$  = número de mililitros de solução titulada de tiosulfato de sódio (4.2).

$x_2$  = normalidade desta solução;

$m$  = massa da tomada de ensaio (6.1.1), expressa em gramas.

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em sulfuretos da ordem de 2% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,2%.

## CAPÍTULO XXVI

### Tosilcloramida sódica (cloramina T) - Doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método descreve o doseamento da tosilcloramida sódica total (cloramina T) nos produtos cosméticos por cromatografia em camada fina.

2 - Definição:

O teor da amostra em cloramina T estabelecido por este método é expresso em percentagem de massa (m/m).

### 3 - Princípio:

Em meio clorídrico a quente, a cloramina T hidrolisa-se totalmente em 4-tolueno-sulfonamida. A quantidade de 4-tolueno-sulfonamida formada é doseada por fotodensitometria após cromatografia em camada fina.

### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Tosilcloramida sódica (cloramina T).

4.2 - Solução padrão de 4-tolueno-sulfonamida: dissolver 50 mg de 4-tolueno-sulfonamida em 100 ml de etanol (4.5).

4.3 - Ácido clorídrico a 37% (m/m) ( $d_4^{20} = 1,18$ )

4.4 - Éter.

4.5 - Etanol a 96% (v/v).

4.6 - Eluente:

4.6.1 - 1-butanol, etanol a 96% (4.5) e água (40:4:9, em volume).

4.6.2 - Clorofórmio e acetona (6:4, em volume).

4.7 - Placas para cromatografia em camada fina de silicagele 60 sem indicador de fluorescência.

4.8 - Permanganato de potássio.

4.9 - Ácido clorídrico a 15% (m/m).

4.10 - Reagente de pulverização: solução a 1% (m/v) de o-toluidina em etanol (4.5).

### 5 - Material:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Material corrente para cromatografia em camada fina.

5.3 - Fotodensitómetro.

### 6 - Técnica:

6.1 - Hidrólise:

Pesar com exactidão, num balão de 50 ml, cerca de 1 g(m) de amostra, juntar 5 ml de água e 5 ml de ácido clorídrico (4.3) e ferver durante uma hora sob refluxo. Transferir imediatamente a suspensão ainda quente, com água, para um balão aferido de 50 ml. Arrefecer e completar o volume com água. Centrifugar pelo menos cinco minutos a 3000 rpm e filtrar o produto sobrenadante.

6.2 - Extração:

6.2.1 - Retirar 30 ml do filtrado e extrair três vezes com 15 ml de éter dietílico (4.4). Secar, se necessário, as fases etéreas e recolhê-las num balão aferido de 50 ml. Completar o volume com éter dietílico (4.4).

6.2.2 - Retirar 25 ml do extracto etéreo, evaporar à secura sob corrente de azoto. Retomar o extracto com 1 ml de etanol (4.5).

6.3 - Cromatografia em camada fina:

6.3.1 - Aplicar sobre uma placa de silicagele 60 (4.7) 20 µl do residuo dissolvido no etanol (6.2). Aplicar do mesmo modo 8 µl, 12 µl, 16 µl e 20 µl da solução padrão de 4-tolueno-sulfonamida (4.2).

6.3.2 - Desenvolver seguidamente até uma altura aproximada de 15 cm com eluente (4.6.1 ou 4.6.2).

6.3.3 - Após evaporação completa do eluente, colocar a placa durante dois a três minutos numa atmosfera de vapores de cloro, obtida do seguinte modo: juntam-se cerca de 100 ml de ácido clorídrico (4.9) a cerca de 2 g de permanganato de potássio (4.8) num recipiente fechado. Expulsar o excesso de cloro, aquecendo a placa a 100°C durante cinco minutos. Pulverizar o reagente sobre a placa (4.10).

6.4 - Determinação:

Após cerca de uma hora, medir a intensidade da coloração das manchas violetas por fotodensitometria a 525 nm (5.3).

6.5 - Estabelecimento da curva de calibração:

A partir da altura dos picos obtidos, traçar a recta de aferição em função das quantidades (4 µg, 6 µg, 8 (mi)g e 10 µg de 4-tolueno-sulfonamida).

7 - Nota. - O método pode ser controlado a partir de soluções a 0,1% ou 0,2% de cloramina T (4.1) tratadas nas mesmas condições que a amostra (6).

8 - Cálculo:

O teor de cloramina T na amostra expresso em percentagem de massa (m/m) é calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{Percentagem (m/m) de cloramina T} = \frac{1,33 \cdot a}{60 \cdot m}$$

onde:

1,33 = factor de conversão de 4-tolueno-sulfonamida em cloramina T;

$a(\mu\text{g})$  = quantidade de 4-tolueno-sulfonamida expressa em microgramas na amostra e lida na recta de calibração;

$m(\mu\text{g})$  = massa da tomada de ensaio, expressa em gramas

9 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em cloramina T da ordem de 0,2% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,03%.

## CAPÍTULO XXVII

### Zinco - Doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento do zinco presente nos produtos cosméticos sob a forma de cloreto, sulfato, fenolsulfato ou de combinações de vários sais em questão.

2 - Definição:

O teor em zinco da amostra, determinado por gravimetria de 2-metil-8-oxiquinoleato de zinco, é expresso em percentagem de massa (m/m) de zinco.

3 - Princípio:

O zinco em solução é precipitado, em meio ácido, sob a forma de 2-metil-8-oxiquinoleato. Após filtração e secagem, o precipitado é pesado.

#### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1 - Amónia concentrada a 25% (m/m): (ver documento original).

4.2 - Ácido acético glacial.

4.3 - Acetato de amónio.

4.4 - 2-metil-8-oxiquinoleína.

4.5 - Solução de amónia a 6% (m/v). Deitar 240 g de amónia concentrada (4.1) num balão graduado de 1000 ml, completar com água destilada e misturar.

4.6 - Solução de acetato de amónio 0,2 M. Dissolver num balão aferido de 1000 ml 15,4 g de acetato de amónio (4.3) com água destilada. Completar com água destilada e misturar.

4.7 - Solução de 2-metil-8-oxiquinoleína. Num balão aferido de 100 ml dissolver 5 g de 2-metil-8-oxiquinoleína em 12 ml de ácido acético glacial. Perfazer até ao traço com água destilada e misturar.

#### 5 - Aparelhagem:

5.1 - Balões aferidos de 100 ml e 1000 ml.

5.2 - Copos de vidro de 400 ml.

5.3 - Provetas graduadas de 50 ml e 150 ml.

5.4 - Pipetas graduadas de 10 ml.

5.5 - Cadinhos filtrantes em vidro G-4.

5.6 - Frascos para filtração sob vácuo de 500 ml.

5.7 - Trompa de água.

5.8 - Termómetro graduado de 0°C a 100°C, pelo menos.

5.9 - Exsicador contendo um exsicante apropriado com indicador higrométrico, por exemplo, gele de sílica ou equivalente.

5.10 - Estufa, regulada numa temperatura de 150°C ± 2°C.

5.11 - Potenciómetro.

5.12 - Placa de aquecimento.

5.13 - Papel de filtro Whatman n.º 4, ou equivalente.

#### 6 - Técnica:

6.1 - Pesar 5 g a 10 g (M) da amostra a examinar, que devem conter 50 mg a 100 mg de zinco, e colocar num copo de 400 ml; juntar 50 ml de água destilada e misturar.

6.1.1 - Filtrar com o auxílio de uma bomba de vácuo, se necessário, e separar o filtrado.

6.1.2 - Repetir de novo a extracção com 50 ml de água destilada. Filtrar e misturar os filtrados.

6.2 - Acrescentar 2 ml de solução de 2-metil-8-oxiquinoleína (4.7) por dezena de miligramas de zinco contido na solução 6.1.2 e misturar.

6.3 - Diluir com 150 ml de água destilada, levar com 5.12 a temperatura da solução a 60°C e acrescentar, agitando, 45 ml da solução de acetato de amónio 0,2 M (4.6).

6.4 - Agitando sempre, levar o pH da solução a 5,7-5,9 com solução de amoníaco (4.5); controlar o pH da solução por meio de um potenciómetro.

6.5 - Deixar repousar trinta minutos, aspirar a solução, por meio de uma trompa de água, através de um cadinho filtrante G-4, previamente seco (150°C) e tarado após arrefecimento (M<sub>0</sub>). Lavar o precipitado recolhido no cadinho com um total de 150 ml de água destilada aquecida a 95°C.

6.6 - Colocar o cadinho numa estufa regulada a 150°C e secar durante uma hora.

6.7 - Retirar o cadinho da estufa, colocá-lo num exsiccador (5.9) e determinar a sua massa ( $M_1$ ) após ter voltado à temperatura ambiente.

7 - Cálculo:

Calcular o teor em zinco da amostra em percentagem de massa (m/m) por meio da fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de zinco} = \frac{(M_1 - M_0) \cdot 17,12}{M}$$

na qual:

$M$  = massa, em gramas, da fracção da amostra examinada no n.º 6.1;

$M_0$  = massa, em gramas, do cadinho filtrante vazio e seco (6.5);

$M_1$  = massa, em gramas, do cadinho filtrante após precipitação (6.7).

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em zinco da ordem de 1% (m/m), a diferença entre os resultados de dois doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar 0,1%.

## CAPÍTULO XXVIII (\*)

### Nitrato de prata - Identificação e doseamento

#### A - Identificação

1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve os ensaios para identificação do nitrato de prata como prata nos produtos cosméticos aquosos.

2 - Princípio:

A prata é identificada pela formação do precipitado branco característico do cloreto de prata.

3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Solução de ácido clorídrico 2 M.

3.2 - Solução de amónia:

Diluir a solução concentrada de amónia ( $d_{20} = 0,88$  g/ml) com igual quantidade de água e homogeneizar.

3.3 - Solução de ácido nítrico 2 M.

4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Centrífuga.

5 - Técnica:

(\*) Os capítulos XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV e XXXV, foram aditados pela Portaria n.º 1192/97, de 22 de Novembro.

5.1 - Num tubo de centrífuga, adicionar a cerca de 1 ml da amostra algumas gotas de solução de ácido clorídrico (3.1) até completa formação de precipitado; agitar e centrifugar.

5.2 - Retirar o líquido sobrenadante e lavar o precipitado com cinco gotas de água fria. Rejeitar a água de lavagem.

5.3 - Adicionar ao tubo de centrífuga que contém o precipitado igual volume de água. Aquecer até à ebulição e agitar.

5.4 - Centrifugar enquanto quente; rejeitar o líquido sobrenadante.

5.5 - Adicionar ao precipitado algumas gotas de solução de amónia (3.2); agitar e centrifugar.

5.6 - Num vidro de relógio, colocar uma gota do líquido sobrenadante e algumas gotas de solução de ácido nítrico 2 M (3.3).

5.7 - A formação de um precipitado branco indica a presença de prata.

## B - Doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método aplica-se ao doseamento do nitrato de prata como prata em produtos cosméticos aquosos, tais como os utilizados para coloração das pestanas ou das sobrancelhas.

2 - Princípio:

A prata é doseada por espectrometria de absorção atómica.

3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Solução de ácido nítrico 0,02 M.

3.2 - Soluções mãe de prata:

3.2.1 - Solução mãe de prata 1000 µg/ml em solução de ácido nítrico 0,5 M (Spectrosol ou equivalente).

3.2.2 - Solução mãe de prata 100 µg/ml: pipetar 10 ml de solução mãe (3.2.1) para um balão volumétrico de 100 ml.

Perfazer o volume com solução de ácido nítrico 0,02 M (3.1) e agitar. Esta solução mãe deverá ser preparada de fresco e conservada em frasco de vidro escuro.

4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Espectrofotómetro de absorção atómica equipado com uma lâmpada de cátodo oco de prata.

5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra:

Para um balão volumétrico de 1000 ml, pesar com exactidão cerca de 0,1 g de uma amostra homogénea do produto, perfazer o volume com a solução de ácido nítrico 0,02 M (3.1) e agitar.

5.2 - Condições para espectrometria de absorção atómica:

Chama: ar/acetileno;

Comprimento de onda: 338,3 nm;

Correcção de fundo: sim;

Condições da chama: fraca; para uma absorvência máxima será necessária a optimização do queimador e do fluxo do combustível.

### 5.3 - Calibração:

5.3.1 - Pipetar respectivamente 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ml da solução padrão de prata (3.2.2) para balões volumétricos de 100 ml.

Perfazer o volume em cada balão com a solução de ácido nítrico 0,02 M (3.1) e agitar. As soluções padrão assim obtidas contêm, respectivamente, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 µg de prata por mililitro.

5.3.2 - Medir a absorvência da solução de ácido nítrico 0,02 M (3.1). Este valor representa o ponto zero da curva de calibração. Medir a absorvência de cada solução padrão de prata (5.3.1), registar os valores de absorvência e traçar a curva de calibração relacionando os valores de absorvência com as concentrações de prata.

### 5.4 - Doseamento:

Medir a absorvência da solução da amostra (5.1). Com base na curva de calibração, determinar a concentração de prata correspondente ao valor de absorvência obtido para a solução da amostra.

### 6 - Cálculo:

O teor em nitrato de prata, em percentagem em massa (% m/m), é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de nitrato de prata} = \frac{1,5748 \times c}{10 \times m}$$

em que:

$m$  = massa da amostra expressa em gramas (5.1);

$c$  = concentração de prata na solução de amostra (5.1), expressa em microgramas por mililitro, obtida a partir da curva de calibração.

### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em nitrato de prata de 4% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deve exceder 0,05% (m/m).

## CAPÍTULO XXIX

### Bissulfureto de selénio em champôs anticaspa Identificação e doseamento

#### A - Identificação

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

O presente método descreve a identificação do bissulfureto de selénio sob a forma de selénio em champôs anticaspa.

##### 2 - Princípio:

O selénio é identificado pela cor característica, entre o amarelo e o cor de laranja, produzida pela reacção com ureia e iodeto de potássio.

### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Ácido nítrico concentrado ( $d_{20} = 1,42$  g/ml).

3.2 - Ureia.

3.3 - Solução de iodeto de potássio a 10% (m/v): dissolver 10 g de iodeto de potássio em 100 ml de água.

### 4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Tubo de digestão com capacidade de 100 ml.

4.3 - Bloco de digestão aquecido.

4.4 - Papel de filtro (Whatman n.º 42 ou equivalente) ou membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 5 - Técnica:

5.1 - Num tubo de digestão (4.2) adicionar, a cerca de 1 g de champô, 2,5 ml de ácido nítrico concentrado (3.1) e deixar digerir no bloco de digestão (4.3) aquecido a 150 C durante trinta minutos.

5.2 - Diluir a amostra digerida, até perfazer 25 ml, com água e filtrar através de papel de filtro ou de uma membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$  (4.4).

5.3 - A 2,5 ml do filtrado acrescentar 5 ml de água e 2,5 g de ureia (3.2) e levar à ebulição. Deixar arrefecer e adicionar 1 ml de solução de iodeto de potássio (3.3).

5.4 - Em presença do selénio produz-se uma cor entre o amarelo e o cor de laranja, que escurece rapidamente.

## B - Doseamento

### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

O presente método aplica-se ao doseamento do bissulfureto de selénio sob a forma de selénio em champôs anticaspa que contêm até 4,5% (m/m) de bissulfureto de selénio.

### 2 - Princípio:

O selénio é determinado por espectrometria de absorção atómica após digestão pelo ácido nítrico.

### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Ácido nítrico concentrado ( $d_{20} = 1,42$  g/ml).

3.2 - Solução de ácido nítrico a 5% (v/v): juntar 50 ml de ácido nítrico concentrado (3.1) a 500 ml de água, num copo, agitando continuamente. Transferir esta solução para um balão volumétrico de 1 l e perfazer o volume com água.

3.3 - Solução mãe de selénio 1000 (mi)g/ml, em solução de ácido nítrico 0,5 M (Spectrosol ou equivalente).

### 4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Tubo de digestão com capacidade de 100 ml.

4.3 - Bloco de digestão aquecido.

4.4 - Papel de filtro (Whatman n.º 42 ou equivalente) ou membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$ .

4.5 - Espectrofotómetro de absorção atómica equipado com uma lâmpada de cátodo oco de selénio.

5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra:

5.1.1 - Pesar com exactidão cerca de 0,2 g (*m* gramas) de uma amostra homogénea de champô e introduzir num tubo de digestão (4.2).

5.1.2 - Juntar 5 ml de ácido nítrico concentrado (3.1) e digerir a 150 C durante uma hora num bloco de digestão (4.3).

5.1.3 - Deixar arrefecer e diluir a 100 ml com água. Filtrar a amostra diluída por um filtro ou uma membrana filtrante de 0,45 µm (4.4). Reservar o filtrado para o doseamento.

5.2 - Condições para espectrometria de absorção atómica:

Chama: ar/acetileno;

Comprimento de onda: 196,0 nm;

Correcção de fundo: sim;

Condições da chama: fraca; para uma absorvência máxima será necessária a optimização do queimador e do fluxo do combustível.

5.3 - Calibração:

5.3.1 - Pipetar respectivamente 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ml da solução mãe de selénio (3.3) para balões volumétricos de 100 ml. Perfazer, em cada balão, o volume com solução de ácido nítrico a 5% (v/v) (3.2) e agitar. As soluções assim obtidas contêm, respectivamente, 10, 20, 30, 40 e 50 (mi)g de selénio por mililitro.

5.3.2 - Medir a absorvência de uma solução de ácido nítrico a 5% (v/v) (3.2). Este valor representa o ponto zero da curva de calibração.

Medir a absorvência de cada solução padrão de selénio (5.3.1) e registar os valores da absorvência. Traçar a curva de calibração relacionando os valores de absorvência com os de concentração de selénio.

5.4 - Doseamento:

Medir a absorvência da solução da amostra (5.1.3).

Com base na curva de calibração, determinar a concentração de selénio correspondente ao valor de absorvência obtida.

6 - Cálculo:

O teor de bissulfureto de selénio da amostra, em percentagem em massa (% m/m), é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de bissulfureto de selénio} = \frac{1,812 \times c}{100 \times m}$$

em que:

*m* = massa da amostra expressa em gramas (5.1.1);

*c* = concentração de selénio na solução de amostra (5.1.3), expressa em microgramas por mililitro, obtida da curva de calibração.

7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de bissulfureto de selênio de 1% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo sobre a mesma amostra não deverá exceder 0,05% (m/m).

## CAPÍTULO XXX

### **Bário e estrôncio solúveis em pigmentos que se apresentam sob a forma de sais ou lacas - Doseamento**

#### **A - Doseamento do bário solúvel**

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve a técnica para a extracção e doseamento do bário solúvel em pigmentos na forma de sais ou lacas.

##### 2 - Princípio:

O pigmento é extraído com solução de ácido clorídrico 0,07 M em condições definidas e a quantidade de bário no solvente de extracção é determinada por espectrometria de absorção atómica.

##### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

###### 3.1 - Etanol absoluto.

###### 3.2 - Solução de ácido clorídrico 0,07 M.

###### 3.3 - Solução de ácido clorídrico 0,5 M.

3.4 - Solução de cloreto de potássio 8% (m/v): dissolver 16 g de cloreto de potássio em 200 ml de solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2).

###### 3.5 - Soluções padrão de bário:

3.5.1 - Solução mãe de bário 1000 µg/ml em solução de ácido nítrico 0,5 M (Spectrosol ou equivalente).

3.5.2 - Solução padrão de bário 200 µg/ml: pipetar 20,0 ml da solução mãe de bário (3.5.1) para um balão volumétrico de 100 ml. Perfazer o volume com solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) e agitar.

##### 4 - Material e equipamento:

###### 4.1 - Material corrente de laboratório.

###### 4.2 - Aparelho de pH (precisão de ± 0,02 unidades).

###### 4.3 - Agitador mecânico para frascos.

###### 4.4 - Membrana filtrante de 0,45 µm.

4.5 - Espectrofotómetro de absorção atómica equipado com uma lâmpada de cátodo de bário.

##### 5 - Técnica:

###### 5.1 - Preparação da amostra:

5.1.1 - Pesar com exactidão cerca de 0,5 g (m grama) de pigmento para um Erlenmeyer com uma capacidade suficiente para uma agitação eficaz (igual ou superior a 150 ml).

5.1.2 - Adicionar 1,0 ml de etanol (3.1), rodar o Erlenmeyer de modo a assegurar o humedecimento completo do pigmento. Com uma bureta, adicionar a quantidade exacta de solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) necessária para obter uma relação

volume de ácido/massa de pigmento de exactamente 50 ml/g. O volume total de solvente de extracção, incluindo o etanol, corresponde a V ml. Agitar o conteúdo do balão durante cinco segundos, para garantir a mistura completa do conteúdo.

5.1.3 - Usando um aparelho pH (4.2), medir o pH da suspensão resultante; se o pH for superior a 1,5, adicionar gota a gota ácido clorídrico 0,5 M (3.3) até ao valor de pH compreendido entre 1,4 e 1,5.

5.1.4 - Tapar e agitar imediatamente o Erlenmeyer durante sessenta minutos, utilizando um agitador mecânico (4.3). A velocidade de agitação deve ser suficientemente alta para produzir espuma. Filtrar com membrana filtrante 0,45 µm (4.4) e recolher o filtrado. Não centrifugar o extracto antes de filtrar. Pipetar 5,0 ml do filtrado para um balão volumétrico de 50 ml; perfazer o volume com solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) e agitar. Esta solução é igualmente utilizada para o doseamento do estrôncio (parte B).

5.1.5 - Pipetar para um balão volumétrico de 100 ml 5,0 ml de solução de cloreto de potássio (3.4) e uma alíquota (WB ml) do filtrado diluído (5.1.4), de modo a obter uma concentração compreendida entre 3 µg e 10 µg de bário por mililitro (uma alíquota de 10 ml deverá constituir um ponto de partida satisfatório). Perfazer o volume com solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) e agitar.

5.1.6 - A determinação da concentração de bário na solução (5.1.5) por espectrometria de absorção atómica deve ser executada no próprio dia.

5.2 - Condições para a espectrometria de absorção atómica:

Chama: óxido nitroso/acetileno;

Comprimento da onda: 553,5 nm;

Correcção de fundo: não;

Condições da chama: fraca; para uma absorvência máxima será necessária a optimização do queimador e do fluxo do combustível.

5.3 - Calibração:

5.3.1 - Pipetar para balões volumétricos de 100 ml 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ml da solução padrão de bário (3.5.2). Pipetar para cada balão 5,0 ml de solução de cloreto de potássio (3.4); perfazer o volume com solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) e agitar. Estas soluções contêm 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 µg de bário por mililitro, respectivamente. Paralelamente, usando o mesmo método, preparar um ensaio em branco, omitindo a solução padrão de bário.

5.3.2 - Medir a absorvência do ensaio em branco (5.3.1) e utilizar o valor obtido como o ponto de concentração zero de bário para a curva de calibração.

Medir a absorvência de cada solução padrão de bário (5.3.1). Traçar a curva de calibração relacionando os valores de absorvência com a concentração de bário.

5.4 - Doseamento:

Medir a absorvência da solução da amostra (5.1.5).

Com base na curva de calibração, determinar a concentração de bário correspondente ao valor da absorvência obtido para a solução da amostra.

6 - Cálculo:

O teor de bário solúvel na amostra (% m/m) é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem (m/m) de bário solúvel} = \frac{c \times V}{10 WBa \times m}$$

em que:

$m$  = massa da amostra analisada, em gramas (5.1.1);  
 $c$  = concentração de bário na solução da amostra (5.1.5), em microgramas por mililitro, obtida a partir da curva de calibração;  
 $V$  = volume total de solvente de extracção, em mililitros (5.1.2);  
 $WBa$  = volume do extracto, em mililitros (5.1.5).

#### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para uma concentração de bário solúvel de 2% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo sobre a mesma amostra não deverá exceder 0,3%.

#### 8 - Observações:

8.1 - Em determinadas condições a absorvência de bário pode ser aumentada pela presença de cálcio. Este efeito pode ser contrariado pela adição de iões de magnésio com uma concentração de 5 g/l <sup>(1)</sup>.

8.2 - É permitida, como alternativa à espectrometria de absorção atómica, a utilização de espectrometria de emissão por plasma hifenada com plasma indutivo.

<sup>(1)</sup> Yarrow M. et al., «Magnesium as modifier for the determination of barium by flame atomic emission spectrometry», Analytical Proceedings, 1991, pp. 28 e 40.

### **B - Determinação do estrôncio solúvel**

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve a técnica para a extracção e o doseamento do estrôncio solúvel em pigmentos na forma de sais ou lacas.

#### 2 - Princípio:

O pigmento é extraído com solução de ácido clorídrico 0,07 M em condições definidas e a quantidade de estrôncio no solvente de extracção é determinada por espectrometria de absorção atómica.

#### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Etanol absoluto.

3.2 - Solução de ácido clorídrico 0,07 M.

3.3 - Solução de cloreto de potássio 8% (m/v): dissolver 16 g de cloreto de potássio em 200 ml de solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2).

3.4 - Soluções padrão de estrôncio:

3.4.1 - Solução mãe de estrôncio concentrada, 1000 µg/ml: em ácido nítrico 0,5 M (Spectrosol ou equivalente).

3.4.2 - Solução padrão de estrôncio 100 µg/ml; pipetar 10,0 ml da solução mãe de estrôncio (3.4.1) para um balão volumétrico de 100 ml. Perfazer com a solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) e agitar.

#### 4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Membrana filtrante de 0,45 µm.

4.3 - Espectrofotómetro de absorção atómica equipado com uma lâmpada de cátodo oco de estrôncio.

5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra:

Utilizar a solução preparada no n.º 5.1.4 da parte A para determinar o conteúdo de estrôncio solúvel.

5.1.1 - Pipetar para balão volumétrico de 100 ml 5,0 ml de solução de cloreto de potássio (3.3) e uma alíquota ( $W_{sr}$  ml) do filtrado diluído (A, 5.1.4), de modo a obter uma concentração compreendida entre 2 µg e 5 µg de estrôncio por mililitro (uma alíquota de 25 ml deverá constituir um ponto de partida satisfatório).

Perfazer o volume do balão com a solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) e agitar.

5.1.2 - A concentração de estrôncio na solução (5.1.1) deve ser determinada por espectrometria de absorção atómica no próprio dia.

5.2 - Condições para espectrometria de absorção atómica:

Chama: óxido nitroso/acetileno;

Comprimento de onda: 460,7 nm;

Correcção de fundo: não;

Condições da chama: fraca; para uma absorvência máxima será necessária a optimização do queimador e do fluxo do combustível.

5.3 - Calibração:

5.3.1 - Pipetar para uma série de balões volumétricos de 100 ml 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ml da solução padrão de estrôncio (3.4.2). Pipetar para cada balão 5 ml de solução de cloreto de potássio (3.3). Perfazer o volume dos balões com a solução de ácido clorídrico 0,07 M (3.2) e agitar. Estas soluções contêm 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 µg de estrôncio por mililitro, respectivamente. Paralelamente, preparar um ensaio em branco, omitindo a solução padrão de estrôncio.

5.3.2 - Medir a absorvência do ensaio em branco (5.3.1). Este valor representa o ponto zero da curva de calibração.

Medir a absorvência de cada solução padrão de estrôncio (5.3.1) e registar os valores. Traçar a curva de calibração, relacionando os valores máximos da absorvência com os da concentração de estrôncio.

5.4 - Doseamento:

Medir a absorvência da solução da amostra (5.1.1). Com base na curva de calibração, determinar o valor da concentração de estrôncio correspondente ao valor de absorvência obtido para a solução da amostra.

6 - Cálculo:

O teor de estrôncio solúvel na amostra em percentagem em massa (% m/m) é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de estrôncio solúvel} = \frac{c \times V}{10 W_{sr} \times m}$$

em que:

$m$  = massa da amostra analisada (A,5.1.1), em gramas;

$c$  = concentração de estrôncio na solução da amostra (5.1.1), expressa em microgramas por mililitro, obtida a partir da curva da calibração;  
 $V$  = volume total do solvente de extracção, em mililitros (A,5.1.2);  
 $W_{sr}$  = volume do extracto, expresso em mililitros (5.1.1).

#### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para uma concentração de estrôncio solúvel de 0,6% (m/m), a diferença entre os resultados em duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deverá exceder 0,09% (m/m).

#### 8 - Observações:

É permitida, como alternativa à espectrometria de absorção atómica de chama, a utilização de espectrometria de emissão óptica de plasma indutivo acoplado.

## CAPÍTULO XXXI

### Álcool benzílico - Identificação e doseamento

#### A - Identificação

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve os ensaios para a identificação do álcool benzílico em produtos cosméticos.

##### 2 - Princípio:

O álcool benzílico é identificado por cromatografia em camada fina em placas de sílica gele.

##### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Álcool benzílico.

3.2 - Clorofórmio.

3.3 - Etanol absoluto.

3.4 - *n*-pentano.

3.5 - Eluente: éter dietílico.

3.6 - Solução padrão de álcool benzílico: pesar 0,1 g de álcool benzílico (3.1) para um balão volumétrico de 100 ml, perfazer o volume com etanol (3.3) e agitar.

3.7 - Placas de vidro para cromatografia em camada fina de 100 mm x 200 mm ou de 200 mm x 200 mm, revestidas com uma camada de 0,25 mm de sílica gele 60F<sub>254</sub>.

3.8 - Revelador: ácido 12-molibdofosfórico, 10% (m/v) em etanol (3.3).

##### 4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório para cromatografia em camada fina.

4.2 - Tina de cromatografia, com dois canais; dimensões globais aproximadas: 80 mm x 230 mm x 240 mm, com tampa.

4.3 - Papel para cromatografia: Whatman ou equivalente.

4.4 - Lâmpada ultravioleta; comprimento de onda 254 nm.

##### 5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra:

Pesar para balão volumétrico de 10 ml 1,0 g do produto a analisar. Adicionar 3 ml de clorofórmio (3.2) e agitar vigorosamente até à dispersão do produto. Perfazer o volume com etanol (3.3) e agitar vigorosamente, por forma a obter uma solução límpida ou quase.

5.2 - Cromatografia em camada fina:

5.2.1 - Saturar a tina de cromatografia (4.2) com n-pentano (3.4) do seguinte modo: revestir a parede da tina adjacente ao canal posterior com papel para cromatografia (4.3), verificando se o bordo inferior do papel se encontra dentro do canal.

Transferir 25 ml de n-pentano (3.4) para o canal posterior, vertendo este solvente sobre a superfície exposta do papel para cromatografia que reveste a parede.

Recolocar imediatamente a tampa e deixar repousar durante quinze minutos, para salvar.

5.2.2 - Aplicar 10 µl de solução da amostra (5.1) e 10 µl da solução padrão de álcool benzílico (3.6) nos pontos adequados da linha de partida de uma placa de cromatografia em camada fina (3.7). Deixar secar.

5.2.3 - Pipetar 10 ml de éter dietílico (3.5) para o canal dianteiro da tina e colocar imediatamente a placa (5.2.2) dentro do mesmo canal. Recolocar rapidamente a tampa da tina e efectuar o desenvolvimento da placa numa distância de 150 mm. Retirar a placa da tina de cromatografia e deixá-la secar à temperatura ambiente.

5.2.4 - Observar a placa (5.2.3) à luz ultravioleta e assinalar a posição das manchas de cor violeta.

Pulverizar a placa com o revelador (3.8) e, em seguida, aquecê-la a 120 C durante cerca de quinze minutos. O álcool benzílico surge sob a forma de uma mancha azul-escura.

5.2.5 - Calcular o valor do Rf da solução padrão de álcool benzílico. Uma mancha azul-escura com um valor Rf igual ao obtido com a solução da amostra indica a presença de álcool benzílico. Limite de detecção: 0,1 µg de álcool benzílico.

## B - Doseamento

1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento de álcool benzílico em produtos cosméticos.

2 - Definição:

A quantidade de álcool benzílico determinada por este método é expressa em percentagem em massa (% m/m).

3 - Princípio:

A amostra é extraída com metanol, determinando-se a quantidade de álcool benzílico presente no extracto por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros e adequados para HPLC.

4.1 - Metanol.

4.2 - 4-etoxifenol.

4.3 - Álcool benzílico.

4.4 - Fase móvel: metanol (4.1)/água (45:55; v/v).

4.5 - Solução mãe de álcool benzílico: pesar com exactidão cerca de 0,1 g de álcool benzílico (4.3) para um balão volumétrico de 100 ml. Perfazer o volume com metanol (4.1) e agitar.

4.6 - Solução do padrão interno: pesar com exactidão cerca de 0,1 g de 4-etoxifenol (4.2) para um balão volumétrico de 100 ml. Perfazer com metanol (4.1) e agitar.

4.7 - Soluções padrão: pipetar para balões volumétricos de 25 ml quantidades da solução mãe de álcool benzílico (4.5) e da solução do padrão interno (4.6), em conformidade com o quadro abaixo indicado.

Perfazer o volume com metanol e agitar.

Solução padrão	Álcool benzílico		4-etoxifenol	
	ml (4.5) adicionados	µg/ml(*)	ml (4.6) adicionados	µg/ml (*)
I.....	0,5	20	2,0	80
II.....	1,0	40	2,0	80
III.....	2,0	80	2,0	80
IV.....	3,0	120	2,0	80
V.....	5,0	200	2,0	80

(\*) Estes valores são fornecidos a título indicativo e correspondem às concentrações de soluções padrão preparadas com as soluções de álcool benzílico (4.5) e de 4-etoxifenol, respectivamente

5 - Material e equipamento:

5.1 - Material corrente de laboratório:

5.2 - Equipamento de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com um detector de ultravioleta de comprimentos de onda variáveis e um injector de loop 10 µl.

5.3 - Coluna analítica; coluna de aço inoxidável de 250 mm x 4,6 mm, cheia de Spherisorb ODS 5 µm ou equivalente.

5.4 - Banho de água.

5.5 - Banho de ultra-sons.

5.6 - Centrífuga.

5.7 - Tubos de centrífuga com capacidade de 15 ml.

6 - Técnica:

6.1 - Preparação da amostra:

6.1.1 - Pesar com exactidão cerca de 0,1 g (m grama) de amostra num tubo de centrífuga (5.7) e adicionar 5 ml de metanol (4.1).

6.1.2 - Aquecer durante dez minutos num banho de água (5.4) mantido a 50 C; em seguida colocar o tubo num banho de ultra-sons (5.5) até a amostra se encontrar completamente dispersa.

6.1.3 - Arrefecer e, em seguida, centrifugar a 3500 rpm durante cinco minutos.

6.1.4 - Transferir o líquido sobrenadante para um balão volumétrico de 25 ml.

6.1.5 - Extrair de novo a amostra com mais 5 ml de metanol (4.1). Combinar os extractos num balão volumétrico de 25 ml.

6.1.6 - Pipetar 2,0 ml de solução do padrão interno (4.6) para um balão volumétrico de 25 ml. Perfazer o volume com metanol (4.1) e agitar. Esta solução é a utilizada na análise descrita no n.º 6.4.

6.2 - Cromatografia:

6.2.1 - Montar o equipamento da cromatografia líquida de alta resolução (5.2) da forma habitual. Ajustar o fluxo da fase móvel (4.4) para 2,0 ml/min.

6.2.2 - Regular o comprimento de onda do detector de UV (5.2) para 210 nm.

6.3 - Calibração:

6.3.1 - Injectar 10 µl de cada uma das soluções padrão de álcool benzílico (4.7) e medir as áreas dos picos correspondentes ao álcool benzílico e ao 4-etoxifenol.

6.3.2 - Calcular, para cada concentração de solução padrão de álcool benzílico (4.7), a razão das áreas dos picos de álcool benzílico e de 4-etoxifenol. Traçar a curva de calibração usando estas razões no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes de álcool benzílico em microgramas por mililitro no eixo das abcissas.

6.4 - Doseamento:

6.4.1 - Injectar 10 µl da solução da amostra (6.1.6) e medir as áreas dos picos correspondentes ao álcool benzílico e ao 4-etoxifenol. Calcular a razão entre as áreas dos picos de álcool benzílico e de 4-etoxifenol. Repetir este processo com outras alíquotas fracções de 10 µl de solução da amostra até obter resultados consistentes.

6.4.2 - A partir da curva de calibração (6.3.2), ler a concentração de álcool benzílico correspondente à razão das áreas dos picos de álcool benzílico e de 4-etoxifenol.

7 - Cálculo:

Calcular o teor de álcool benzílico na amostra, em percentagem em massa, utilizando a fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de álcool benzílico} = \frac{c}{400 \times m}$$

em que:

$m$  = massa da amostra, expressa em gramas, em análise (6.1.1);

$c$  = concentração de álcool benzílico na solução da amostra (6.1.6), expressa em microgramas por mililitro, obtida a partir da curva de calibração.

8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de álcool benzílico de 1% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo da mesma amostra não deve ultrapassar 0,10%.

## CAPÍTULO XXXII

### **Zircónio, alumínio e cloro em antitranspirantes não aerossólicos Identificação e doseamento**

#### **Identificação do zircónio e doseamento do zircónio, do alumínio e do cloro em antitranspirantes não aerossólicos**

O método inclui cinco fases:

A - Identificação do zircónio;

B - Doseamento do zircónio;

C - Doseamento do alumínio;

D - Doseamento do cloro;

E - Cálculo das razões entre átomos de alumínio e átomos de zircónio e entre átomos de alumínio mais zircónio e átomos de cloro.

## A - Identificação do zircónio

### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve a identificação do zircónio em produtos cosméticos antitranspirantes não aerossólicos.

Não foram feitas tentativas para descrever métodos adequados à identificação do complexo hidroxicloreto de alumínio e zircónio  $[Al_xZr(OH)_yCl_z \cdot nH_2O]$ .

### 2 - Princípio:

O zircónio é identificado pela formação de um precipitado vermelho-violeta característico produzido com o vermelho-de-alizarina S em meio fortemente ácido.

### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.:

3.1 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_{20} = 1,18$  g/ml).

3.2 - Solução de vermelho-de-alizarina S (CI:58005) solução aquosa, a 2%, de sulfonato de sódio e alizarina.

### 4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

### 5 - Técnica:

5.1 - Num tubo de ensaio, adicionar 2 ml de água a cerca de 1 g da amostra. Tapar e agitar.

5.2 - Adicionar três gotas de solução de vermelho-de-alizarina S (3.2) e seguidamente 2 ml de ácido clorídrico concentrado (3.1). Tapar e agitar.

5.3 - Deixar repousar aproximadamente dois minutos.

5.4 - Um precipitado e uma solução sobrenadante de cor vermelho-violeta indicam a presença de zircónio.

## B - Doseamento do zircónio

1 - Objectivo e campo de aplicação. Este método descreve o doseamento de zircónio em complexos de hidroxicloreto de alumínio e zircónio até uma concentração máxima de 7,5% (m/m) de zircónio em antitranspirantes não aerossólicos.

### 2 - Princípio:

O zircónio, depois de extraído em meio fortemente ácido, é doseado por espectrometria de absorção atómica.

### 3 - Reagentes:

Os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_{20} = 1,18$  g/ml).

3.2 - Solução de ácido clorídrico a 10% (v/v): adicionar 100 ml de ácido clorídrico concentrado (3.1) a 500 ml de água numa proveta, agitando continuamente. Transferir esta solução para um balão volumétrico de 1 l, perfazendo o volume com água.

3.3 - Solução mãe de zircónio, 1000 µg/ml em solução de ácido clorídrico 0,5 M (*Spectrosol* ou equivalente).

3.4 - Solução ácida de cloreto de alumínio hidratado [ $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ]: dissolver 22,6 g de cloreto de alumínio hexa-hidratado em 250 ml de solução de ácido clorídrico (3.2) a 10% (v/v).

3.5 - Solução ácida de cloreto de amónio: dissolver 5,0 g de cloreto de amónio em 250 ml de solução de ácido clorídrico (3.2) a 10% (v/v).

4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Placa de aquecimento com agitação mecânica.

4.3 - Papel de filtro (Whatman n.º 41 ou equivalente).

4.4 - Espectrofotómetro de absorção atómica equipado com uma lâmpada de cátodo oco de zircónio.

5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra:

5.1.1 - Pesar com exactidão cerca de 1,0 g (*m* grama) de uma amostra homogénea do produto para um copo de 150 ml. Adicionar 40 ml de água e 10 ml de ácido clorídrico concentrado (3.1).

5.1.2 - Colocar o copo na placa de aquecimento com agitação magnética (4.2).

Agitar e aquecer até à ebulição. Para evitar uma secagem rápida, tapar o copo com um vidro de relógio.

Manter a ebulição durante cinco minutos, retirar o copo da placa e deixar arrefecer à temperatura ambiente.

5.1.3 - Filtrar o conteúdo do copo com papel de filtro (4.3) para um balão volumétrico de 100 ml. Lavar o copo com duas porções de 10 ml de água e filtrar para o mesmo balão volumétrico. Perfazer o volume com água e agitar. Esta solução é também utilizada para o doseamento do alumínio (parte C).

5.1.4 - Pipetar para um balão volumétrico de 50 ml 20 ml da solução da amostra (5.1.3), 5 ml de solução ácida de cloreto de alumínio (3.4) e 5 ml de solução ácida de cloreto de amónio (3.5). Perfazer o volume com uma solução de ácido clorídrico (3.2) a 10% (v/v) e agitar.

5.2 - Condições para espectrometria de absorção atómica:

Chama: óxido de azoto/acetileno;

Comprimento de onda: 360,1 nm;

Correcção de fundo: não;

Condições da chama: forte; para uma absorvência máxima será necessária a optimização do queimador e do fluxo do combustível.

5.3 - Calibração:

5.3.1 - Pipetar respectivamente 5,00, 10,00, 15,00, 20,00 e 25,00 ml de solução padrão mãe de zircónio (3.3) para balões volumétricos de 50 ml. Adicionar, com pipeta, a cada balão 5,00 ml de solução ácida de cloreto de alumínio (3.4) e 5,00 ml de solução de cloreto de amónio (3.5). Perfazer o volume com solução de ácido clorídrico (3.2) a 10% e agitar. Estas soluções contêm, respectivamente, 100, 200, 300, 400 e 500 µg de zircónio por mililitro. De igual modo preparar um ensaio em branco, omitindo a solução padrão de zircónio.

5.3.2 - Medir a absorvência do ensaio em branco. Este valor representa o ponto de concentração zero da curva de calibração. Medir a absorvência de cada solução padrão

de zircónio (5.3.1), registar estes valores e traçar a curva de calibração relacionando os valores de absorvência com a concentração de zircónio.

#### 5.4 - Doseamento:

Medir a absorvência da solução da amostra (5.1.4). Com base na curva de calibração, determinar a concentração de zircónio correspondente ao valor de absorvência obtido.

#### 6 - Cálculo:

Calcular o teor de zircónio da amostra, em percentagem em massa (% m/m), utilizando a fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de zircónio} = \frac{c}{40 \times m}$$

em que:

$m$  = massa da amostra, expressa em gramas (5.1.1);

$c$  = concentração de zircónio na solução da amostra (5.1.4), expressa em microgramas por mililitro, obtida a partir da curva de calibração.

#### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de zircónio de 3,00% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deverá exceder 0,10% (m/m).

#### 8 - Observações:

É permitida, como alternativa à espectrometria de absorção atómica de chama, a utilização de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivo acoplado.

### C - Doseamento do alumínio

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve os ensaios para o doseamento do alumínio nos complexos de hidroxiloreto de alumínio e zircónio até uma concentração máxima de 12% (m/m) de alumínio em antitranspirantes não aerossólicos.

#### 2 - Princípio:

O alumínio é extraído do produto em meio ácido e doseado por espectrometria de absorção atómica.

#### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Ácido clorídrico concentrado ( $d_{20} = 1,18$  g/ml).

3.2 - Solução de ácido clorídrico, 1% (v/v): adicionar 10 ml de ácido clorídrico concentrado (3.1) a 500 ml de água, num copo, agitando continuamente. Transferir quantitativamente esta solução para balão volumétrico de 1000 ml e perfazer com água.

3.3 - Solução mãe de alumínio, 1000 µg/ml em solução de ácido nítrico 0,5 M (*Spectrosol* ou equivalente).

3.4 - Solução ácida de cloreto de potássio: dissolver 10,0 g de cloreto de potássio em 250 ml de solução de ácido clorídrico a 1% (v/v) (3.2).

#### 4 - Material e equipamento:

##### 4.1 - Material corrente de laboratório:

4.2 - Espectrofotómetro de absorção atómica equipado com lâmpada de cátodo oco de alumínio.

#### 5 - Técnica:

##### 5.1 - Preparação da amostra:

O doseamento do teor de alumínio é efectuado sobre a solução preparada na parte B, n.º 5.1.3.

5.1.1 - Pipetar 5,00 ml da solução da amostra (B, 5.1.3) e 10,00 ml de solução de cloreto de potássio (3.4) para um balão volumétrico de 100 ml. Perfazer com solução de ácido clorídrico a 1% (v/v) (3.2) e agitar.

##### 5.2 - Condições para a espectrometria de absorção atómica:

Chama: óxido de azoto/acetileno;

Comprimento de onda: 309,3 nm;

Correcção de fundo: não;

Condições de chama: forte; para uma absorvência máxima será necessária a optimização do queimador e do fluxo do combustível.

##### 5.3 - Calibração:

5.3.1 - Pipetar respectivamente 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 e 5,00 ml de solução mãe de alumínio (3.3) para balões volumétricos de 100 ml. Adicionar a cada um dos balões 10,00 ml de solução ácida de cloreto de potássio (3.4) e perfazer com solução de ácido clorídrico a 1% (v/v) (3.2) e agitar.

As soluções padrão assim obtidas contêm, respectivamente, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de alumínio por mililitro.

De igual modo preparar um ensaio em branco, omitindo a solução padrão de alumínio.

5.3.2 - Medir a absorvência do ensaio em branco (5.3.1). Este valor representa o ponto de concentração do alumínio zero da curva de calibração. Medir a absorvência de cada solução padrão de alumínio (5.3.1), registar os valores de absorvência e traçar a curva de calibração relacionando os valores da absorvência com os da concentração de alumínio.

##### 5.4 - Doseamento:

Medir a absorvência da solução da amostra (5.1.1).

Com base na curva de calibração, determinar a concentração de alumínio correspondente ao valor da absorvência obtido.

#### 6 - Cálculo:

Calcular o teor de alumínio da amostra, em percentagem em massa (% m/m), utilizando a fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de alumínio} = \frac{c}{5 \times m}$$

em que:

$m$  = massa, em gramas, da amostra para análise (B,5.1.1);

$c$  = concentração de alumínio na solução da amostra(5.1.1), expressa em microgramas por mililitro, obtida na curva de calibração.

#### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de alumínio de 3,5% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deve exceder 0,10% (m/m).

#### 8 - Observações:

É permitida, como alternativa à espectrometria de absorção atómica de chama, a utilização de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivo acoplado.

### D - Doseamento do cloro

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve os ensaios para a determinação do cloro na sua forma iónica em complexos hidroxicloreto de alumínio e zircónio em antitranspirantes não aerossólicos.

#### 2 - Princípio:

O ião cloreto no produto é doseado por titulação potenciométrica com uma solução padrão de nitrato de prata.

#### 3 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Ácido nítrico concentrado ( $d_{20} = 1,42$  g/ml).

3.2 - Solução de ácido nítrico, 5% (v/v): adicionar 25 ml de ácido nítrico concentrado (3.1) a 250 ml de água, numa proveta, agitando continuamente. Transferir quantitativamente esta solução para um balão volumétrico de 500 ml e perfazer com água.

3.3 - Acetona:

3.4 - Nitrato de prata, solução padrão 0,1 M (AnalaR ou equivalente).

#### 4 - Material e equipamento:

4.1 - Material corrente de laboratório.

4.2 - Placa com agitação magnética.

4.3 - Eléctrodo de prata.

4.4 - Eléctrodo de referência de calomelanos.

4.5 - Potenciómetro adequado a uma titulação potenciométrica.

#### 5 - Técnica:

##### 5.1 - Preparação da amostra:

5.1.1 - Pesar com exactidão cerca de 1,0 g (*m* grama) de uma amostra homogénea do produto num copo de 250 ml. Adicionar 80 ml de água e 20 ml de solução de ácido nítrico a 5% (v/v) (3.2).

5.1.2 - Colocar o copo na placa de agitação e aquecimento (4.2). Agitar e aquecer até à ebulição. Para evitar uma secagem rápida, tapar o copo com um vidro de relógio. Manter à ebulição cinco minutos, retirar o copo da placa e deixar arrefecer à temperatura ambiente.

5.1.3 - Adicionar 10 ml de acetona (3.3), mergulhar os eléctrodos (4.3 e 4.4) abaixo da superfície da solução e começar a agitar. Titular potenciometricamente com

uma solução de nitrato de prata 0,1 M (3.4) e traçar uma curva diferencial para determinar o ponto de equivalência (V ml).

6 - Cálculo:

Calcular o teor em cloro da amostra, em percentagem em massa (% m/m), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m) de cloro} = \frac{0,3545 \times V}{m}$$

em que:

$m$  = massa, em gramas, da amostra tomada para análise (5.1.1);

$V$  = volume de nitrato de prata 0,1 M (5.1.3), em mililitros, gasto para atingir o ponto de equivalência (5.1.3).

7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de cloro de 4% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo sobre a mesma amostra não deverá exceder 0,10% (m/m).

#### **E - Cálculo das razões entre os átomos de alumínio e os átomos de zircónio e entre os átomos de alumínio mais os átomos de zircónio e os átomos de cloro.**

1 - Cálculo da razão entre os átomos de alumínio e os átomos de zircónio:

Calcular a razão Al:Zr utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Razão Al:Zr} = \frac{\% \text{Al(m/m)} \times 91,22}{\% \text{Zr(m/m)} \times 26,98}$$

2 - Cálculo da razão de átomos de alumínio mais átomos de zircónio para átomos de cloro:

Calcular a razão (Al + Zr): Cl utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Razão (Al+Zr):Cl} = \frac{\frac{\% \text{Al (m/m)}}{26,98} + \frac{\% \text{Zr (m/m)}}{91,22}}{\frac{\% \text{Cl (m/m)}}{35,45}}$$

### **CAPÍTULO XXXIII**

#### **Hexamidina, dibromo-hexamidina, dibromopropamidina e cloro-hexidina - Identificação e doseamento**

1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método descreve a determinação qualitativa e quantitativa de:

Hexamidina e respectivos sais, incluindo o isetionato e o 4-hidroxibenzoato;

Dibromo-hexamidina e respectivos sais, incluindo o isetionato;

Dibromopropamidina e respectivos sais, incluindo o isetionato;

Diacetato, digluconato e dicloridrato de cloro-hexidina em produtos cosméticos.

## 2 - Definição:

As concentrações de hexamidina, dibromo-hexamidina, dibromopropamidina e cloro-hexidina determinadas por este método são expressas em percentagem em massa (% m/m).

## 3 - Princípio:

A identificação e o doseamento são efectuados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) iónica de fase reversa, seguida de detecção por espectrofotometria UV. A hexamidina, a dibromo-hexamidina, a dibromopropamidina e a cloro-hexidina são identificadas pelos seus tempos de retenção na coluna cromatográfica.

## 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros e adequados para a HPLC, quando necessário.

### 4.1 - Metanol.

### 4.2 - Sal de sódio mono-hidratado do ácido 1-heptanossulfónico.

### 4.3 - Ácido acético glacial ( $d_{20} = 1,05$ g/ml).

### 4.4 - Cloreto de sódio.

### 4.5 - Fases móveis:

4.5.1 - Solvente I: solução 0,005 M do sal de sódio mono-hidratado do ácido 1-heptanossulfónico (4.2) em metanol (4.1) ajustada a pH de 3,5 com ácido acético glacial (4.3).

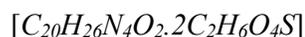
4.5.2 - Solvente II: solução aquosa 0,005 M do sal de sódio mono-hidratado do ácido 1-heptanossulfónico (4.2) ajustada a pH de 3,5 com ácido acético glacial (4.3).

*Nota.* - Caso seja necessário melhorar a forma dos picos, as fases móveis podem ser alteradas e preparadas da seguinte forma:

Solvente I: dissolver 5,84 g de cloreto de sódio (4.4) e 1,1013 g de sal de sódio mono-hidratado do ácido 1-heptanossulfónico (4.2) em 100 ml de água. Adicionar 900 ml de metanol (4.1) e ajustar a pH 3,5 com ácido acético glacial (4.3);

Solvente II: dissolver 5,84 g de cloreto de sódio (4.4) e 1,1013 g de sal de sódio mono-hidratado do ácido 1-heptanossulfónico (4.2) em 1 l de água e ajustar a pH 3,5 com ácido acético glacial (4.3).

### 4.6 - Diisetonato de hexamidina



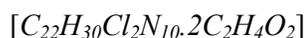
### 4.7 - Diisetonato de dibromo-hexamidina



### 4.8 - Diisetonato de dibromopropamidina



## 4.9 - Diacetato de cloro-hexidina



4.10 - Soluções padrão: preparar soluções a 0,05% (m/v) de cada um dos quatro conservantes (4.6 a 4.9) no solvente I (4.5.1).

4.11 - 3,4,4'-tricloro carbanilida (triclocarban).

4.12 - 4,4'-dicloro-3(trifluorometil)-carbanilida (halocarban).

## 5 - Material e equipamento:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Cromatógrafo de fase líquida de alta resolução com detector de UV de comprimento de onda variável.

5.3 - Coluna analítica, em aço inoxidável; comprimento: 30 cm; diâmetro interno: 4 mm, cheia com  $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub>, 10  $\mu$ m, ou equivalente.

5.4 - Banho de ultra-sons.

## 6 - Identificação:

## 6.1 - Preparação da amostra:

Pesar aproximadamente 0,5 g da amostra num balão volumétrico de 10 ml. Perfazer com o solvente I (4.5.1). Colocar o balão volumétrico num banho de ultra-sons (5.4) durante dez minutos.

Filtrar ou centrifugar a solução. Recolher o filtrado ou o líquido sobrenadante para proceder à identificação por HPLC.

## 6.2 - Cromatografia:

## 6.2.1 - Gradiente de fase móvel:

Tempo (min.)	Solvente I (% v/v) (4.5.1)	Solvente II (% v/v) (4.5.2)
0.....	50	50
15.....	65	35
30.....	65	35
45.....	50	50

6.2.2 - Regular o fluxo da fase móvel (6.2.1) para 1,5 ml/min. e fixar a temperatura da coluna em 35 C.

6.2.3 - Ajustar o detector de comprimento de onda para 264 nm.

6.2.4 - Injectar 10  $\mu$ l de cada uma das soluções padrão (4.10) e registar os respectivos cromatogramas.

6.2.5 - Injectar 10  $\mu$ l de solução da amostra (6.1) e registar o seu cromatograma.

6.3 - Verificar se estão presentes a hexamidina, dibromo-hexamidina, dibromopropamidina ou a cloro-hexidina, comparando o(s) tempo(s) de retenção do(s) pico(s) registado(s) no n.º 6.2.5 com os obtidos com as soluções padrão do n.º 6.2.4.

## 7 - Doseamento:

## 7.1 - Preparação das soluções padrão:

Utilizar um dos conservantes (4.6 a 4.9) não presente na amostra como padrão interno. Em alternativa, utilizar o triclorocarban (4.11) ou o halocarban (4.12).

7.1.1 - Solução mãe do conservante identificado no n.º 6.3 a 0,05% (m/v) no solvente I (4.5.1).

7.1.2 - Solução mãe do conservante escolhido para padrão interno a 0,05% (m/v) no solvente I (4.5.1).

7.1.3 - Preparar quatro soluções padrão de cada conservante identificado, transferindo para balões graduados de 10 ml quantidades da respectiva solução mãe (7.1.1) e quantidades apropriadas da solução mãe do padrão interno (7.1.2), de acordo com o quadro abaixo indicado. Completar o volume de cada balão com o solvente I (4.5.1) e homogeneizar:

Solução padrão	Solução mãe do padrão interno (7.1.2)	Solução mãe do padrão identificado (7.1.1)	
	ml adicionados	ml adicionados	µg/ml (*)
I.....	1,0	0,5	25
II.....	1,0	1,0	50
III.....	1,0	1,5	75
IV.....	1,0	2,0	100

(\*) Estes valores são fornecidos a título indicativo e correspondem às concentrações do conservante identificado nas soluções padrão preparadas com a solução mãe, que contém exactamente 0,05% do conservante identificado

## 7.2 - Preparação da amostra:

7.2.1 - Pesar com exactidão cerca de 0,5 g (p grama) de amostra para um balão volumétrico de 10 ml, adicionar 1,0 ml da solução de padrão interno (7.1.2) e 6 ml de solvente I (4.5.1) e homogeneizar.

7.2.2 - Colocar o balão graduado, durante dez minutos, num banho de ultra-sons (5.4). Depois de arrefecido, perfazer o volume com o solvente I e homogeneizar.

Filtrar com um filtro de pregas ou centrifugar. Recolher o filtrado ou o fluido sobrenadante, consoante o caso, para proceder à análise cromatográfica.

## 7.3 - Cromatografia:

7.3.1 - Regular o fluxo da fase móvel, o seu débito, a temperatura da coluna e o comprimento de onda do detector do equipamento de HPLC (5.2) de acordo com as condições exigidas na fase de identificação (6.2.1 a 6.2.3).

7.3.2 - Injectar 10 µl da solução da amostra (7.2.2) e medir as áreas dos picos. Repetir o processo com fracções de 10 µl da solução da amostra até obter resultados consistentes. Calcular a razão entre a área do pico do composto a analisar e a área do pico do padrão interno.

## 7.4 - Calibração:

7.4.1 - Injectar 10 µl de cada uma das soluções padrão (7.1.3) e medir as áreas dos picos.

7.4.2 - Para cada solução padrão (7.1.3), calcular a razão entre a área do pico da hexamidina, da dibromo-hexamidina, da dibromopropamidina ou da cloro-hexidina e a área do pico do padrão interno. Traçar uma curva de calibração colocando estas razões em ordenada e as concentrações correspondentes do conservante identificado nas soluções padrão, em microgramas por mililitro, em abcissa.

7.4.3 - Na curva de calibração (7.4.2), ler a concentração do conservante identificado correspondente à relação da área do pico calculada no n.º 7.3.2.

## 8 - Cálculos:

Calcular o teor de hexamidina, de dibromo-hexamidina, de dibromopropamidina ou de clorohexidina da amostra, em percentagem em massa, utilizando a fórmula:

$$\text{Percentagem (m/m)} = \frac{c}{1000 \times p} \times \frac{MW_1}{MW_2}$$

em que:

$p$  = massa, em gramas, da amostra tomada para análise (7.2.1);

$c$  = concentração do conservante na solução da amostra, em microgramas por mililitro, obtida a partir da curva de calibração;

$MW_1$  = peso molecular da forma básica do conservante presente;

$MW_2$  = peso molecular do sal correspondente (v. n.º 10).

9 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para uma concentração de 0,1% (m/m) de hexamidina, dibromo-hexamidina, dibromopropamidina ou de cloro-hexidina, a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas na mesma amostra, não deve ser superior a 0,005%.

10 - Quadro das fórmulas e respectivos pesos moleculares:

	Fórmula	Peso molecular
Hexamidina.....	$C_{20}H_{26}N_4O_2$	354,45
Diisetonato de hexamidina.....	$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	606,72
Di- <i>p</i> -hidroxibenzoato de hexamidina.....	$C_{20}H_{26}N_4O_2 \cdot 2C_7H_6O_3$	630,71
Dibromo-heximidina.....	$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2$	512,24
Diisetonato de dibromo-hexamidina.....	$C_{20}H_{24}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	764,51
Dibromopropamidina.....	$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2$	470,18
Diisetonato de dibromopropamidina.....	$C_{17}H_{18}Br_2N_4O_2 \cdot 2C_2H_6O_4S$	722,43
Cloro-hexidina.....	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$	505,45
Diacetatode cloro-hexidina.....	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$	625,56
Digloconato de cloro-hexidina.....	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$	897,76
Dicloridato de cloro-hexidina.....	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2HCl$	578,37

## CAPÍTULO XXXIV

### Ácido benzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido sórbico, ácido salicílico e ácido propiónico - Identificação e doseamento.

1 - Objectivo e campo de aplicação:

O método é utilizado na identificação e doseamento do ácido benzóico, do ácido 4-hidroxibenzóico, do ácido sórbico, do ácido salicílico e do ácido propiónico em produtos cosméticos. Em procedimentos separados, é descrita a identificação destes conservantes; o doseamento do ácido benzóico, do ácido 4-hidroxibenzóico, do ácido salicílico e o doseamento do ácido propiónico.

2 - Definição:

Os teores em ácido benzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido salicílico, ácido sórbico e ácido propiónico determinados segundo este método são expressos em percentagem por massa dos ácidos livres.

## A - Identificação

### 1 - Princípio:

Após a extracção ácido base dos conservantes, o extracto é analisado por cromatografia de camada fina (TLC) utilizando uma técnica de derivatização. Com base nos resultados obtidos, a identificação é confirmada por cromatografia em fase líquida de alta resolução (HPLC) ou, no caso do ácido propiónico, por cromatografia em fase gasosa (GC).

### 2 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros.

Deverá ser utilizada água destilada ou de pureza equivalente.

2.1 - Acetona.

2.2 - Éter dietílico.

2.3 - Acetonitrilo.

2.4 - Tolueno.

2.5 - n-hexano.

2.6 - Parafina líquida.

2.7 - Solução de ácido clorídrico 4 M.

2.8 - Solução de hidróxido de potássio 4 M.

2.9 - Cloreto de cálcio,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

2.10 - Carbonato de lítio,  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ .

2.11 - 2-bromo-2-acetonaftona.

2.12 - Ácido 4-hidroxibenzoico.

2.13 - Ácido salicílico.

2.14 - Ácido benzoico.

2.15 - Ácido sórbico.

2.16 - Ácido propiónico.

2.17 - Soluções padrão:

Preparar soluções a 0,1% m/v (100 mg/100 ml) de cada um dos cinco conservantes (2.12 a 2.16) em éter dietílico (2.2).

2.18 - Reagente de derivatização:

Solução a 0,5% (m/v) de 2-bromo-2'-acetonaftona (2.11) em acetonitrilo (2.3) (50 mg/10 ml). Esta solução deverá ser preparada todas as semanas e guardada no frigorífico.

2.19 - Solução catalisadora:

Solução a 0,3% (m/v) de carbonato de lítio (2.10) em água (300 mg/100 ml). Esta solução deverá ser preparada de fresco.

2.20 - Solvente de eluição:

Tolueno (2.4)/acetona (2.1) (20:0,5; v/v)

2.21 - Parafina líquida (2.6)/n-hexano (2.5) (1:2; v/v).

### 3 - Material e equipamento:

Material corrente de laboratório:

3.1 - Banho de água a 60 C.

3.2 - Tina de cromatografia.

3.3 - Fonte de luz ultravioleta, 254 e 366 nm

3.4 - Placas de camada fina Kieselgel 60, sem indicador de fluorescência, 20 cm x 20 cm, camada de 0,25 mm de espessura com zona de concentração de 2,5 cm x 20 cm (Merck 11845 ou equivalente).

3.5 - Microseringa, 10 µl.

3.6 - Microseringa, 25 µl.

3.7 - Estufa para temperaturas acima de 105°C.

3.8 - Tubos de vidro de 50 ml com tampas de rosca.

3.9 - Papel de filtro, 90 mm de diâmetro, Scheilder & Schull, Weissband n.º 5892 ou equivalente.

3.10 - Papel indicador de pH 1-11.

3.11 - Frasco para amostras, em vidro, de 5 ml.

3.12 - Evaporador rotativo (Rotavapor ou equivalente).

3.13 - Placa de aquecimento.

#### 4 - Técnica:

##### 4.1 - Preparação da amostra:

Pesar aproximadamente 1 g da amostra num tubo de vidro de 50 ml com a tampa de rosca (3.8). Adicionar quatro gotas de ácido clorídrico 4 M (2.7) e 40 ml de acetona (2.1). Para produtos fortemente básicos, como o sabonete, adicionar 20 gotas de ácido clorídrico 4 M (2.7). Verificar se o pH é, aproximadamente, 2 utilizando papel indicador (3.10). Tapar o tubo e agitar vigorosamente durante um minuto.

Se necessário, para facilitar a extracção dos conservantes para a fase de acetona, aquecer progressivamente a mistura até cerca de 60°C para fundir a fase lipídica. Arrefecer a solução até atingir a temperatura ambiente e filtrar com um papel de filtro (3.9) para um Erlenmeyer.

Transferir 20 ml do filtrado para um Erlenmeyer de 200 ml, adicionar 20 ml de água e agitar. Ajustar o pH da mistura com hidróxido de potássio 4 M (2.8) até cerca de pH 10. Utilizar o papel indicador (3.10) para medir o pH.

Adicionar 1 g de cloreto de cálcio (2.9) e agitar vigorosamente. Filtrar com um filtro de papel (3.9) para uma ampola de decantação de 250 ml contendo 75 ml de éter dietílico (2.2) e agitar vigorosamente durante um minuto. Deixar separar e recolher a camada aquosa para um frasco cónico de 250 ml. Eliminar a camada de éter. Recorrendo a papel indicador (3.10), ajustar o pH da solução aquosa até aproximadamente 2 com ácido clorídrico 4 M (2.7) e transferir para uma ampola de decantação. Adicionar 10 ml de éter dietílico (2.2), rolar a ampola e agitar cuidadosamente durante um minuto. Deixar separar e transferir o extracto etéreo para um balão adaptável ao evaporador rotativo (3.12). Rejeitar a camada aquosa.

Evaporar o extracto etéreo até ficar quase seco e se redissolver o resíduo em 1 ml de éter dietílico (2.2). Transferir a solução obtida para um frasco de amostras (3.11).

##### 4.2 - Cromatografia em camada fina:

Para cada padrão ou amostra a cromatografar, aplicar cerca de 3 µl de solução de carbonato de lítio (2.19) com uma seringa (3.5), a distâncias regulares, na linha de partida da zona de concentração da placa de cromatografia em camada fina (3.4) e secar numa corrente de ar frio.

Colocar esta placa sobre uma placa de aquecimento (3.13), a 40°C, para manter as manchas tão pequenas quanto possível. Com uma microseringa (3.5) aplicar 10 µl de cada solução padrão (2.17) e da solução de amostra (4.1) na linha de partida da placa, nos pontos exactos em que a solução de carbonato de lítio foi aplicada.

Finalmente, aplicar cerca de 15 µl de reagente de derivatização (2.18) nos mesmos pontos em que foram aplicadas as soluções padrão/amostra e a solução de carbonato de lítio.

Aquecer a placa de cromatografia em camada fina numa estufa (3.7) a 80°C durante quarenta e cinco minutos.

Após arrefecimento, eluir a placa numa tina (3.2) saturada durante quinze minutos (sem utilizar papel de filtro), recorrendo ao eluente (2.20), até a frente do solvente atingir uma distância de 15 cm (pode demorar aproximadamente oitenta minutos).

Secar a placa numa corrente de ar frio e examinar as manchas obtidas sob luz ultravioleta (UV) (3.3). Para permitir a fluorescência das manchas fracas, mergulhar a placa de cromatografia fina em parafina/n-hexano (2.21).

#### 5 - Identificação:

Calcular o Rf para cada mancha.

Comparar o Rf e o comportamento sob radiação UV obtido para a amostra com os obtidos para as soluções padrão.

Tirar conclusões preliminares relativamente à presença e identidade dos conservantes presentes. Proceder à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) descrita na secção B ou, se se verificar a presença de ácido propiónico, à cromatografia em fase gasosa (GC) descrita na secção C. Comparar os tempos de retenção obtidos para a amostra com os das soluções de referência.

Relacionar os resultados de cromatografia em camada fina com os de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) ou de cromatografia em fase gasosa (GC). Basear a identificação dos conservantes presentes na amostra nos resultados combinados.

### **B - Doseamento do ácido benzóico, do ácido 4-hidrobenzóico do ácido sórbico e do ácido salicílico**

#### 1 - Princípio:

Após a acidificação, a amostra é extraída com uma mistura de etanol e água. Depois da filtração, os conservantes são determinados através da cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

#### 2 - Reagentes:

2.1 - Todos os reagentes devem ser analiticamente puros e apropriados para cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), quando aplicável. Deverá ser utilizada água destilada ou de pureza equivalente.

2.2 - Etanol, absoluto.

2.3 - Ácido 4-hidroxibenzóico.

2.4 - Ácido salicílico.

2.5 - Ácido benzóico.

2.6 - Ácido sórbico.

2.7 - Acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O).

2.8 - Ácido acético,  $d_4^{20} = 1,05$  g/ml.

2.9 - Acetonitrilo.

2.10 - Ácido sulfúrico 2 M.

2.11 - Hidróxido de potássio, aquoso, 0,2 M.

2.12 - Ácido 2-metoxibenzóico.

2.13 - Mistura etanol/água:

Misturar 9 volumes de etanol (2.2) e 1 volume de água destilada (2.1).

2.14 - Solução de padrão interno:

Preparar uma solução contendo cerca de 1 g de ácido 2-metoxibenzóico (2.12) em 500 ml de mistura de etanol/água (2.13).

2.15 - Fase móvel para cromatografia líquida de alta resolução (HPLC):

2.15.1 - Tampão de acetato: adicionar 6,35 g de acetato de sódio (2.7) e 20,0 ml de ácido acético (2.8) a 1 l de água e misturar.

2.15.2 - Preparar a fase móvel, misturando 9 volumes de tampão acetato (2.15.1) com 1 volume de acetonitrilo (2.9).

2.16 - Solução mãe de conservantes:

Pesar com exactidão cerca de 0,05 g de ácido 4-hidroxibenzóico (2.3), 0,2 g de ácido salicílico (2.4), 0,2 g de ácido benzóico (2.5) e 0,05 g de ácido sórbico (2.6) num balão volumétrico de 50 ml e perfazer com mistura etanol/água (2.13). Guardar esta solução no frigorífico. A solução é estável durante uma semana.

2.17 - Soluções padrão dos conservantes:

Transferir da solução mãe concentrada (2.16) respectivamente 8,00, 4,00, 2,00, 1,00 e 0,50 ml para um conjunto de balões volumétricos de 20 ml. A cada balão adicionar 10,00 ml de solução de padrão interno (2.14) e 0,5 ml de ácido sulfúrico 2 M (2.10). Perfazer os 20 ml com a mistura etanol/água (2.13). Estas soluções deverão ser preparadas na altura da utilização.

3 - Material e equipamento:

Material corrente de laboratório:

3.1 - Banho-maria, regulado a 60°C.

3.2 - Equipamento de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com detector de UV de comprimento de onda variável e dispositivo de injeção de loop de 10 µl.

3.3 - Coluna:

Aço inoxidável, comprimento de 12,5 cm-25 cm, diâmetro interno de 4,6 mm, enchimento com nucleosil 5C18 ou equivalente.

3.4 - Papel de filtro; diâmetro: 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband n.º 5892, ou equivalente.

3.5 - Tubos de vidro de 50 ml com tampa de rosca.

3.6 - Frascos de vidro para amostras, 5 ml.

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

4 - Técnica:

4.1 - Preparação da amostra:

4.1.1 - Preparação da amostra sem adição de padrão interno:

Pesar 1 g da amostra num tubo de vidro de 50 ml com tampa de rosca (3.5). Adicionar, com uma pipeta, 1,00 ml de ácido sulfúrico 2 M (2.10) e 40,0 ml de mistura etanol/água (2.13). Juntar aproximadamente 1 g de regularizadores para/de bulição (3.7), fechar o tubo e agitar vigorosamente durante um minuto, pelo menos, até obter uma suspensão homogénea. Colocar o tubo durante cinco minutos exactos em água a 60°C (3.1), para facilitar a extracção dos conservantes para a fase etanólica. Arrefecer imediatamente o tubo num fluxo de água fria e manter o extracto à temperatura de 5°C durante uma hora.

Filtrar o extracto com papel de filtro (3.4). Transferir aproximadamente 2 ml do extracto para um frasco de amostras (3.6). Conservar o extracto a 5°C e proceder ao

doseamento por cromatografia líquida de alta resolução nas vinte e quatro horas subsequentes à preparação.

#### 4.1.2 - Preparação da amostra com adição de padrão interno:

Pesar com exactidão de 3 casas decimais 0,001 g, 1 g  $\pm$  0,1 g (*a* gramas) de amostra num tubo de vidro de 50 ml com tampa de rosca (3.5). Com uma pipeta, adicionar 1,00 ml de ácido sulfúrico 2 M (2.10) e 30,0 ml de mistura etanol/água (2.13). Juntar cerca de 1 g de regularizadores de ebulição (3.7) e 10,00 ml da solução de padrão interno (2.14). Fechar o tubo e agitar vigorosamente durante um minuto, pelo menos, até obter uma suspensão homogénea. Colocar o tubo durante exactamente cinco minutos em água à temperatura de 60°C (3.1), para facilitar a extracção dos conservantes para a fase etanólica.

Arrefecer imediatamente o tubo num fluxo de água fria e manter o extracto à temperatura de 5°C durante uma hora.

Filtrar o extracto com papel de filtro (3.4). Transferir aproximadamente 2 ml do filtrado para um frasco para amostras (3.6). Manter o filtrado à temperatura de 5°C e realizar o doseamento por cromatografia líquida de alta resolução nas vinte e quatro horas subsequentes à preparação.

#### 4.2 - Cromatografia líquida de alta resolução:

Fase móvel: acetonitrilo/tampão acetato (2.15).

Ajustar o fluxo da fase móvel na coluna a 2,0 ml/min.  $\pm$  0,5 ml/min.

Fixar o detector de comprimento de onda em 240 nm.

##### 4.2.1 - Calibração:

Injectar quantidades de 10  $\mu$ l de cada uma das soluções padrão diluídas de conservantes (2.17) no cromatógrafo de fase líquida (3.2). Relativamente a cada solução, determinar as razões entre as alturas dos picos dos conservantes analisados e a altura do pico do padrão interno dos cromatogramas obtidos. Elaborar um gráfico para cada conservante, relacionando a razão da altura do pico com a concentração de cada solução padrão diluída.

Verificar se se obtém uma resposta linear para as soluções padrão diluídas no processo de calibração.

##### 4.2.2 - Doseamento:

Injectar 10  $\mu$ l do extracto da amostra (4.1.1) no cromatógrafo de fase líquida (3.2) e registar o cromatograma. Injectar 10  $\mu$ l de uma solução padrão de conservante (2.17) e registar o cromatograma. Comparar os cromatogramas obtidos. Se no cromatograma do extracto de amostra (4.1.1) não ocorrerem picos com, aproximadamente, o mesmo tempo de retenção do ácido 2-metoxibenzóico (padrão interno recomendado), injectar 10  $\mu$ l de extracto da amostra com padrão interno (4.1.2) no cromatógrafo líquido e registar o cromatograma.

Se se verificar a interferência de um pico no cromatograma do extracto da amostra (4.1.1) com o mesmo tempo de retenção do ácido 2-metoxibenzóico, seleccionar outro padrão interno adequado (se um dos conservantes em estudo não aparecer no cromatograma, esse conservante poderá ser utilizado como padrão interno).

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

O pico de separação do par menos separado deverá ser de 0,90, pelo menos (para uma definição de pico de separação, observar a figura 1):



Figura 1. — Pico de separação

Se não se obtiver a separação necessária, haverá que utilizar uma coluna mais eficaz ou adaptar a composição da fase móvel até serem alcançadas as condições pretendidas;

O factor de assimetria  $A_s$  de todos os picos deverá estar compreendido entre 0,9 e 1,5 (para uma definição de factor de assimetria do pico, v. figura 2).

Para registar o cromatograma com vista à determinação do factor de assimetria recomenda-se uma velocidade de banda de registo não inferior a 2 cm/min.;

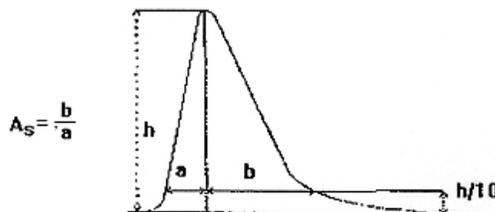


Figura 2. — Factor de assimetria do pico

Deverá obter-se uma linha de base estável.

#### 5 - Cálculo:

Utilizar a razão entre as alturas dos picos dos conservantes analisados e a altura do pico do ácido 2-metoxibenzóico (padrão interno) e o gráfico de calibração para calcular a concentração dos conservantes ácidos na solução de amostra. Calcular o teor de ácido benzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido sórbico ou de ácido salicílico na amostra, em percentagem em massa ( $x_i$ ), utilizando a fórmula:

$$x_i \% (m/m) = \frac{100.20.b}{10^6.a} = \frac{b}{500.a}$$

em que:

$a$  = massa (g) da amostra para análise (4.1.2);

$b$  = concentração (microgramas por mililitros) do conservante no extracto da amostra (4.1.2) obtido no gráfico de calibração.

#### 6 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor de ácido 4-hidroxibenzóico de 0,40%, a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve ultrapassar um valor absoluto de 0,035%.

Para um teor de ácido benzóico de 0,50%, a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve ultrapassar um valor absoluto de 0,050%.

Para um teor de ácido salicílico de 0,50%, a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve ultrapassar um valor absoluto de 0,045%.

Para um teor de ácido sórbico de 0,60%, a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve ultrapassar um valor absoluto de 0,035%.

#### 7 - Observações:

7.1 - Os resultados de um teste de robustez do método indicaram que a quantidade de ácido sulfúrico adicionada para extrair os ácidos da amostra é crítica, devendo a quantidade de amostra utilizada manter-se dentro dos limites prescritos.

7.2 - Se se desejar, poderá ser utilizada uma pré-coluna adequada.

### C - Doseamento do ácido propiónico

#### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método é aplicável para o doseamento do ácido propiónico em todos os produtos cosméticos até uma concentração máxima de 2% (m/m).

#### 2 - Definição:

A concentração de ácido propiónico determinada segundo este método é expressa em percentagem de massa (% m/m) do produto.

#### 3 - Princípio:

Após extracção do ácido propiónico do produto, o doseamento é feito por cromatografia em fase gasosa (GC), utilizando o ácido 2-metilpropiónico como padrão interno.

#### 4 - Reagentes:

Todos os reagentes devem ser analiticamente puros; deverá ser utilizada água destilada ou de pureza equivalente.

4.1 - Etanol 96% (v/v).

4.2 - Ácido propiónico.

4.3 - Ácido 2-metilpropiónico.

4.4 - Ácido ortofosfórico 10% (m/v).

4.5 - Solução de ácido propiónico.

Pesar com exactidão aproximadamente 1,00 g (*p* gramas) de ácido propiónico num balão volumétrico de 50 ml e perfazer com etanol (4.1).

4.6 - Solução de padrão interno:

Pesar aproximadamente 1,00 g (*e* gramas) de ácido 2-metilpropiónico num balão volumétrico de 50 ml e perfazer com etanol (4.1).

#### 5 - Material e equipamento:

5.1 - Material corrente de laboratório.

5.2 - Equipamento para cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama.

5.3 - Tubo de vidro (20 mm x 150 mm) com tampa de rosca.

5.4 - Banho-maria à temperatura de 60°C.

5.5 - Seringa de vidro de 10 ml com filtro de membrana (diâmetro dos poros: 0,45 µm).

## 6 - Técnica:

### 6.1 - Preparação da amostra:

#### 6.1.1 - Preparação da amostra sem o padrão interno.

Pesar aproximadamente 1 g da amostra num tubo de vidro (5.3). Adicionar 0,5 ml de ácido fosfórico (4.4) e 9,5 ml de etanol (4.1).

Tapar o tubo e agitar vigorosamente. Se necessário, colocar o tubo em água à temperatura de 60°C (5.4) durante cinco minutos, para dissolver completamente a fase lipídica. Arrefecer rapidamente sob água corrente.

Filtrar uma parte da solução com um filtro de membrana (5.5). Proceder à cromatografia do filtrado no próprio dia.

#### 6.1.2 - Preparação da amostra com padrão interno:

Pesar com exactidão até três casas decimais 0,001 g, 1 g  $\pm$  0,1 g (*a* gramas) de amostra num tubo de vidro (5.3). Adicionar 0,5 ml de ácido ortofosfórico (4.4), 0,50 ml de solução de padrão interno (4.6) e 9 ml de etanol (4.1).

Tapar o tubo e agitar vigorosamente. Se necessário, colocar o tubo em água à temperatura de 60°C (5.4) durante cinco minutos, para dissolver a fase lipídica. Arrefecer rapidamente sob água corrente. Filtrar parte da solução com um filtro de membrana (5.5). Proceder à cromatografia do filtrado no próprio dia.

### 6.2 - Condições para cromatografia em fase gasosa (GC):

Recomendam-se as seguintes condições:

#### Coluna:

Tipo - aço inoxidável;  
Comprimento - 2 m;  
Diâmetro - 1/8";

Enchimento - 10% SP<sup>TM</sup> 1000 (ou equivalente) + 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em Chromosorb WAW 100-120 *mesh*;

#### Temperatura:

Injector - 200°C;  
Coluna - 120°C;  
Detector - 200°C;

#### Gás vector:

Azoto;  
Fluxo - 25 ml/min.

### 6.3 - Cromatografia:

#### 6.3.1 - Calibração:

Pipetar respectivamente 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 4,00 ml de solução de ácido propiónico (4.5) para balões volumétricos de 20 ml. Adicionar a cada um, com uma pipeta, 1,00 ml de solução de padrão interno (4.6); perfazer o volume de 20 ml com etanol (4.1) e misturar. As soluções assim preparadas contêm *e* mg/ml de ácido 2-metilpropiónico como padrão interno (ou seja, 1 mg/ml se *e* = 1,000) e *p/4*, *p/2*, *p*, *2p*,

4p mg/ml de ácido propiónico (ou seja, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 4,00 mg/ml se  $p = 1,000$ ).

Injectar 1 µl de cada uma destas soluções e obter a curva de calibração inscrevendo no eixo dos «x» a relação entre as massas do ácido propiónico e no eixo dos «y» a relação entre as áreas de pico correspondentes.

Proceder a três injeções de cada solução e calcular a média das razões das áreas dos picos.

#### 6.3.2 - Doseamento:

Injectar 1 µl do filtrado da amostra do n.º 6.1.1. Comparar o cromatograma com o de uma das soluções padrão (6.3.1). Se o pico apresentar um tempo de retenção sensivelmente análogo ao do ácido 2-metilpropiónico, mudar o padrão interno. Se não se observar interferência, injectar 1 µl do filtrado da amostra do n.º 6.1.2 e medir as áreas do pico do ácido propiónico e do pico do padrão interno.

Fazer três injeções de cada solução e calcular a média das razões das áreas dos picos.

#### 7 - Cálculos:

7.1 - A partir da curva de calibração obtida no n.º 6.3.1, determinar a razão e massas ( $K$ ), correspondente à razão de áreas dos picos calculada no n.º 6.3.2.

7.2 - A partir da razão de massas obtida desta forma, calcular o teor ( $x$ ) de ácido propiónico na amostra, em percentagem em massa, recorrendo à fórmula:

$$x\% \text{ (m/m)} = K \frac{05.100.e}{50.a} = K \frac{e}{a}$$

em que:

$k$  = razão calculada no n.º 7.1;

$e$  = massa, em gramas, do padrão interno pesado no n.º 4.6;

$a$  = massa, em gramas, da amostra pesada no n.º 6.1.2.

Expressar o resultado com uma casa decimal.

#### 8 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

Para um teor em ácido propiónico de 2% (m/m), a diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra não deve ultrapassar 0,12%.

## CAPÍTULO XXXV

### **Hidroquinona, éter monometílico de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona e éter monobenzílico de hidroquinona - Identificação e doseamento.**

#### **A - Identificação**

##### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve a detecção e a identificação da hidroquinona, do éter monometílico de hidroquinona, do éter monoetilico de hidroquinona e do éter monobenzílico de hidroquinona (monobenzona) em produtos cosméticos para branqueamento da pele.

## 2 - Princípio:

A hidroquinona e os respectivos éteres são identificados por cromatografia em camada fina (TLC).

## 3 - Reagentes:

Os reagentes devem ser analiticamente puros.

3.1 - Etanol 96% (v/v).

3.2 - Clorofórmio.

3.3 - Éter dietílico

3.4 - Eluente:

Clorofórmio (3.2)/éter dietílico (3.3), 66:33 (v/v).

3.5 - Amónia, 25% (m/m) ( $d_4^{20} = 0,91$  g/ml).

3.6 - Ácido ascórbico.

3.7 - Hidroquinona.

3.8 - Éter monometílico de hidroquinona.

3.9 - Éter monoetílico de hidroquinona.

3.10 - Éter monobenzílico de hidroquinona (monobenzona).

3.11 - Soluções padrão:

As seguintes soluções padrão devem ser preparadas de fresco e mantêm-se estáveis durante um dia:

3.11.1 - Pesar 0,05 g de hidroquinona (3.7) num tubo de ensaio graduado de 10 ml. Adicionar 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) e 5 ml de etanol a 96% (3.1).

Adicionar amónia (3.5) até pH 10 e perfazer o volume de 10 ml com etanol (3.1).

3.11.2 - Pesar 0,05 g de éter monometílico de hidroquinona (3.8) num tubo de ensaio graduado de 10 ml. Adicionar 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) e 5 ml de etanol (3.1). Adicionar amónia (3.5) até pH 10 e perfazer o volume de 10 ml com etanol (3.1).

3.11.3 - Pesar 0,05 g de éter monoetílico de hidroquinona (3.9) num tubo de ensaio graduado de 10 ml. Adicionar 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) e 5 ml de etanol (3.1). Adicionar amónia (3.5) até pH 10 e perfazer o volume de 10 ml com etanol (3.1).

3.11.4 - Pesar 0,05 g de éter monobenzílico de hidroquinona (3.10) num tubo de ensaio graduado de 10 ml. Adicionar 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) e 5 ml de etanol (3.1). Adicionar amónia (3.5) até pH 10 e perfazer o volume de 10 ml com etanol (3.1).

3.12 - Nitrato de prata.

3.13 - Ácido 12-fosfomolibdico.

3.14 - Ferrocianeto de potássio hexa-hidratado.

3.15 - Cloreto férrico hexa-hidratado.

3.16 - Reagentes para revelação:

3.16.1 - A uma solução aquosa de nitrato de prata (3.12) a 5% (m/v) adicionar amónia (3.5) até dissolução do precipitado formado.

Aviso. - A solução torna-se instável em repouso (risco de explosão) e deve ser eliminada após utilização.

3.16.2 - Solução a 10% (m/v) de ácido 12-fosfo-molibdico (3.13) em etanol (3.1).

3.16.3 - Preparar uma solução aquosa de ferrocianeto de potássio (3.14) a 1% (m/v) e um soluto aquoso de cloreto férrico (3.15) a 2% (m/v). Misturar partes iguais de ambos os solutos imediatamente antes da utilização.

## 4 - Material e equipamento:

- 4.1 - Material corrente de laboratório.
- 4.2 - Equipamento convencional de TLC.
- 4.3 - Placas de TLC pré-preparadas: sílica gele GHR/UV<sub>254</sub>; 20 cm x 20 cm (Machery, Nagel ou equivalente); espessura da camada: 0,25 mm.
- 4.4 - Banho de ultra-sons.
- 4.5 - Centrífuga.
- 4.6 - Lâmpada UV, 254 nm.

## 5 - Técnica:

### 5.1 - Preparação da amostra:

Pesar 3,0 g da amostra num tubo de ensaio graduado de 10 ml. Adicionar 0,250 g de ácido ascórbico (3.6) e 5 ml de etanol (3.1). Ajustar a pH 10 com amónia (3.5). Perfazer o volume com etanol (3.1). Rolhar o tubo e homogeneizar num banho de ultra-sons durante dez minutos. Filtrar através de papel de filtro ou centrifugar a 3000 rpm.

### 5.2 - TLC:

5.2.1 - Saturar uma tina de cromatografia com o eluente (3.4).

5.2.2 - Depositar numa placa 2 µl de solução padrão (3.11) e 2 µl de solução da amostra (5.1). Eluir à temperatura ambiente ao abrigo da luz até que a frente do solvente tenha migrado 15 cm desde o ponto de partida.

5.2.3 - Retirar a placa e deixar secar à temperatura ambiente.

### 5.3 - Detecção:

5.3.1 - Observar a placa à luz UV a 254 nm e assinalar a posição das manchas.

5.3.2 - Nebulizar a placa com:

Reagente de nitrato de prata (3.16.1); ou

Reagente de ácido fosfomolibdico (3.16.2); aquecer aproximadamente até 120°C; ou

Solução de ferrocianeto de potássio e solução de cloreto férrico (3.16.3).

## 6 - Identificação:

Calcular o valor de R<sub>f</sub> para cada mancha.

Comparar as manchas obtidas para a solução da amostra com as obtidas a partir das soluções padrão relativamente a: valores de R<sub>f</sub>; cor das manchas sob radiação UV; cor das manchas após visualização reveladora.

Executar a técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) descrita na parte B e comparar os tempos de retenção obtidos para o(s) pico(s) da solução da amostra com os das soluções padrão.

Relacionar os resultados obtidos pelas técnicas TLC e HPLC para identificar a presença de hidroquinona e ou dos respectivos éteres.

## 7 - Observações:

Nas condições descritas, observam os seguintes valores de R<sub>f</sub>:

Hidroquinona - 0,32;

Éter monometílico de hidroquinona - 0,53;

Éter monoetilico de hidroquinona - 0,55;

Éter monobenzílico de hidroquinona - 0,58.

## B - Doseamento

### 1 - Objectivo e campo de aplicação:

Este método descreve o doseamento da hidroquinona, do éter monometílico de hidroquinona, do éter monoetílico de hidroquinona e do éter monobenzílico de hidroquinona em produtos cosméticos para branqueamento da pele.

### 2 - Princípio:

A amostra é extraída com uma mistura água/metanol, com aquecimento suave, para fundir quaisquer lípidos presentes. O doseamento é realizado por cromatografia líquida de fase reversa com detecção UV.

### 3 - Reagentes:

3.1 - Os reagentes devem ser analiticamente puros. A água utilizada deve ser destilada a/ou pelo menos de pureza equivalente.

3.2 - Metanol.

3.3 - Hidroquinona.

3.4 - Éter monometílico de hidroquinona.

3.5 - Éter monoetílico de hidroquinona.

3.6 - Éter monobenzílico de hidroquinona (monobenzona).

3.7 - Tetra-hidrofurano para HPLC.

3.8 - Mistura água/metanol 1:1 (v/v). Misturar 1 volume de água e 1 volume de metanol (3.2).

3.9 - Fase móvel: mistura de tetra-hidrofurano/água 45:55 (v/v). Misturar 45 volumes de tetra-hidrofurano (3.7) e 55 volumes de água.

3.10 - Solução padrão:

Pesar 0,06 g de hidroquinona (3.3), 0,08 g de éter monometílico de hidroquinona (3.4), 0,10 g de éter monoetílico de hidroquinona (3.5) e 0,12 g de éter monobenzílico de hidroquinona (3.6) para num balão volumétrico de 50 ml. Dissolver e perfazer o volume com metanol (3.2). Preparar a solução padrão diluindo 10,00 ml desta solução para 50,00 ml com a mistura água/metanol (3.8).

Estas soluções têm de ser preparadas de fresco.

### 4 - Material e equipamento:

Material corrente de laboratório:

4.1 - Banho-maria a 60°C.

4.2 - Cromatógrafo de fase líquida de alta resolução (HPLC) com um detector de UV de comprimento de onda variável e um dispositivo de injeção de 10 µl de loop.

4.3 - Coluna:

Coluna cromatográfica de aço inoxidável, de 250 mm de comprimento, diâmetro interno de 4,6 mm, com enchimento de fenil Zorbax (fenetilsilano ligado quimicamente em Zorbax SIL, com os grupos silanol livres derivatizados com trimetilclorosilano partículas de 6 mm, ou equivalente). Não utilizar pré-colunas, com excepção das pré-colunas do tipo fenil ou equivalente.

4.4 - Papel de filtro, diâmetro de 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband n.º 5892 ou equivalente.

### 5 - Técnica:

5.1 - Preparação da amostra:

Pesar com a exactidão de três casas decimais  $1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  ( $a$  gramas) de amostra num balão volumétrico de 50 ml. Dispersar a amostra em 25 ml de mistura água/metanol (3.8). Fechar o recipiente e agitar vigorosamente até obter uma suspensão homogénea. Agitar durante pelo menos um minuto. Colocar o recipiente em banho-maria (4.2) a  $60^\circ\text{C}$ , a fim de aumentar a extracção. Arrefecer o recipiente e perfazer o volume com a mistura água/metanol (3.8). Filtrar o extracto com papel de filtro (4.4).

Executar a determinação HPLC nas vinte e quatro horas subsequentes à preparação do extracto.

5.2 - Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC):

5.2.1 - Ajustar o fluxo da fase móvel (3.9) para 1,0 ml/min. e fixar o detector de comprimento de onda em 295 nm.

5.2.2 - Injectar 10  $\mu\text{l}$  da solução da amostra, obtida conforme descrito no n.º 5.1, e registar o cromatograma. Medir as áreas dos picos.

Calibrar conforme descrito no n.º 5.2.3. Comparar os cromatogramas obtidos para as soluções amostra e padrão. Utilizar as áreas dos picos e os factores da resposta (RF) calculados no n.º 5.2.3 para determinar a concentração das substâncias a analisar na solução da amostra.

5.2.3 - Calibração:

Injectar 10  $\mu\text{l}$  da solução padrão (3.10) e registar o cromatograma. Injectar várias vezes até obter uma área de pico constante.

Determinar o factor resposta  $RF_i$ :

$$RF_i = \frac{p_i}{c_i}$$

em que:

$p_i$  = área do pico de hidroquinona, éter monometílico de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona ou éter monobenzílico de hidroquinona;

$c_i$  = concentração (gramas por 50 ml) na solução padrão (3.10) de hidroquinona, éter monometílico de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona ou éter metílico de hidroquinona, éter monoetilico de hidroquinona ou éter monobenzílico de hidroquinona.

Verificar se os cromatogramas obtidos para as soluções padrão e amostra obedecem aos seguintes requisitos:

A separação de picos do par de picos pior separados deve ser, no mínimo, de 0,90 (para definição da separação de picos, v. figura 1):

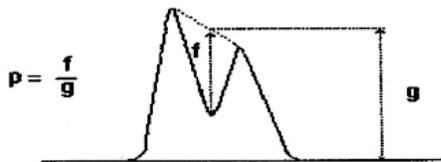


Figura 1. — Separação dos picos

Se não se obtiver a separação necessária, haverá que utilizar uma coluna mais eficaz ou adaptar a composição da fase móvel até serem alcançadas as condições pretendidas;

O factor de assimetria  $A_s$  de todos os picos obtidos deve situar-se na gama 0,9 a 1,5 (para definição do factor de assimetria de picos, v. figura 2). Para registar o cromatograma com vista à determinação do factor de assimetria, recomenda-se uma velocidade de registo de pelo menos 2 cm/min.:

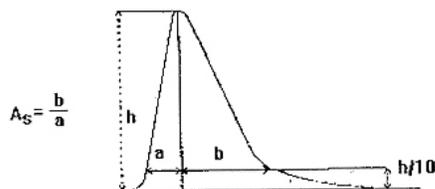


Figura 2. — Factor de assimetria dos picos

Deverá obter-se uma linha de base estável.

#### 6 - Cálculo:

Utilizar as áreas dos picos das substâncias a analisar para calcular as respectivas concentrações na amostra. Calcular a concentração da substância a analisar na amostra, em percentagem por massa (x), por meio da seguinte fórmula:

$$X_i \% (m/m) = \frac{b_i \times 100}{RF_i \cdot a}$$

em que:

$a$  = massa da amostra, em gramas;

$b_i$  = área de pico da substância  $i$  a analisar na amostra;

$RF_i$  = factor de resposta.

#### 7 - Repetibilidade (segundo a norma ISO 5725):

7.1 - Para um teor de hidroquinona de 2,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deve exceder um valor absoluto de 0,13%.

7.2 - Para um teor de éter monometílico de hidroquinona de 1,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deve exceder um valor absoluto de 0,1%.

7.3 - Para um teor de éter monoetilico de hidroquinona de 1,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deve exceder um valor absoluto de 0,11%.

7.4 - Para um teor de éter monobenzílico de hidroquinona de 1,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em paralelo na mesma amostra não deve exceder um valor absoluto de 0,11%.

#### 8 - Reprodutibilidade (segundo a norma ISO 5725):

8.1 - Para um teor de hidroquinona de 2,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas na mesma amostra em condições diferentes (laboratórios, operadores, material e ou tempo de execução diferentes) não deve exceder um valor absoluto de 0,37%.

8.2 - Para um teor de éter monometílico de hidroquinona de 1,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas na mesma amostra em condições diferentes (laboratórios, operadores, material e ou tempo de execução diferentes) não deve exceder um valor absoluto de 0,21%.

8.3 - Para um teor de éter de monoetilico de hidroquinona de 1,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas na mesma amostra em condições diferentes (laboratórios, operadores, material e ou tempo de execução diferentes) não deve exceder um valor absoluto de 0,19%.

8.4 - Para um teor de éter monobenzílico de hidroquinona de 1,0%, a diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas na mesma amostra em condições diferentes (laboratórios, operadores, material e ou tempo de execução diferentes) não deve exceder um valor absoluto de 0,11%.

#### 9 - Observações:

9.1 - Quando se determinar um teor de hidroquinona consideravelmente superior a 2% e for necessário um cálculo exacto, o extracto da amostra (5.1) deve ser diluído até atingir uma concentração idêntica à que seria obtida com uma amostra com um teor de hidroquinona de 2% e a determinação repetida (com alguns equipamentos, a absorvência pode situar-se fora da gama de linearidade do detector para concentrações elevadas de hidroquinona).

#### 9.2 - Interferências:

O método acima descrito permite a determinação da hidroquinona e dos respectivos éteres com um único ciclo isocrático. A utilização da coluna de fenil garante uma retenção suficiente de hidroquinona, retenção essa que não pode ser garantida quando é utilizada uma coluna C18 com a fase móvel descrita.

No entanto, este método está sujeito a interferências devidas aos parabenos. Em tal caso, a determinação deve ser repetida recorrendo a um sistema diferente de fase móvel/fase estacionária. Nas referências 1 e 2 estão descritos os métodos adequados, nomeadamente:

Coluna Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 cm, ou equivalente:

Temperatura: 36°C;

Fluxo: 1,5 ml/min.;

Fase móvel:

Para a hidroquinona: metanol/água 5/95 (v/v);

Para o éter monometílico de hidroquinona metanol/água 30/70 (v/v);

Para o éter monobenzílico de hidroquinona metanol/água 80/20 (v/v) <sup>(1)</sup>.

Coluna Spherisorb S5-ODS ou equivalente:

Fase móvel: água/metanol 90/10 (v/v);

Fluxo: 1,5 ml/min.

Estas condições são adequadas para a hidroquinona <sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> M. Herpol-Borremans and M. O. Masse, «Identification et dosage de l'hydroquinone et ses éthers méthylique et benzylique dans les produits cosmétiques pour blanchir la peau», *Int. J. Cosmet, Sci* 8-203-214 (1986).

(<sup>2</sup>) *J. Firth and I. Rix, «Determination of Hydroquinone in skintoning creams», Analyst (1986), 111, p. 129.*