

382L0434

30. 6. 82

Jornal Oficial das Comunidades Europeias

Nº L 185/1

SEGUNDA DIRECTIVA DA COMISSÃO**de 14 de Maio de 1982****relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos**

(82/434/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

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

Tendo em conta a Directiva 76/768/CEE do Conselho, de 27 de Julho de 1976, relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos produtos cosméticos⁽¹⁾, modificada pela Directiva 79/661/CEE⁽²⁾ e, nomeadamente, o nº 1 do seu artigo 8º,

Considerando que a Directiva 76/768/CEE prevê controlos oficiais dos produtos cosméticos que visam verificar se são respeitadas as condições previstas pelas disposições comunitárias respeitantes à composição dos produtos cosméticos;

Considerando que é conveniente estabelecer o mais rapidamente possível todos os métodos de análise necessários e que a primeira fase para atingir esta finalidade, tendo sido efectuada pela fixação de certos métodos na Directiva 80/1335/CEE da Comissão⁽³⁾, a fixação dos métodos de identificação dos agentes de oxidação e de doseamento do peróxido de hidrogénio nos produtos capilares, de identificação e de doseamento semiquantitativo de certos corantes de oxidação nas tinturas capilares, de identificação e de doseamento dos nitritos, de identificação e de doseamento do formaldeído livre, de doseamento da resorcina nos champôs e nas loções capilares, de doseamento do metanol em relação ao etanol ou ao 2-propanol, constituem uma segunda fase;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão conformes com o parecer do comité para a adaptação ao progresso técnico da Directiva 76/768/CEE,

Artigo 1º

Os Estados-membros tomarão todas as medidas adequadas para que, aquando dos controlos oficiais dos produtos cosméticos:

- a identificação dos agentes de oxidação e doseamento do peróxido de hidrogénio nos produtos capilares,
- a identificação e o doseamento semiquantitativo de determinados corantes de oxidação nas tinturas capilares,
- a identificação e o doseamento dos nitritos,
- a identificação e o doseamento do formaldeído livre,
- o doseamento da resorcina nos champôs e nas loções capilares,
- o doseamento do metanol em relação ao etanol ou ao 2-propanol

sejam efectuados segundo os métodos descritos no anexo.

Artigo 2º

Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares ou administrativas necessárias para darem cumprimento à presente directiva o mais tardar em 31 de Dezembro de 1983. Desse facto informarão imediatamente a Comissão.

Artigo 3º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 14 de Maio de 1982.

Pela Comissão

Karl-Heinz NARJES

Membro da Comissão

(1) JO nº L 262 de 27. 9. 1976, p. 169.

(2) JO nº L 192 de 31. 7. 1979, p. 35.

(3) JO nº L 383 de 31. 12. 1980, p. 27.

ANEXO

I. IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES DE OXIDAÇÃO E DOSEAMENTO DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO NOS PRODUTOS CAPILARES**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 os iodetos para formar o iodo. Antes de empreender 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 DOS PERSULFATOS, BROMATOS E DO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO**1. PRINCÍPIO**

O persulfato 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, v)****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.º 3 e n.º 4 ou equivalente)****3.2. Micropipeta de um l.****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 e 5g do produto em 100 ml de água. Para efectuar a cromatografia sobre papel descrita no ponto 5, utilizar 1 μ l de cada uma destas soluções.

4.2. Produtos parcialmente solúveis na água

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

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

4.3. Cremes

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

5. TÉCNICA

5.1. Em duas tinas para cromatografia descendente em papel, colocar uma certa quantidade de eluentes A (ponto 2.2) e B (ponto 2.3). Saturar as tinas com vapores dos eluentes durante 24 horas pelo menos.

5.2. Numa tira de papel para cromatografia (Whatman nº 3 ou equivalente) de 40 cm de comprimento e 20 cm de largura (ponto 3.1) ou doutro formato adequado, colocar em cada ponto de partida 1 μ l de uma das soluções (ou suspensões filtradas) de amostra e de produto de referência preparadas de acordo com os pontos 4 e 2.1 e fazer evaporar o solvente ao ar.

5.3. Colocar a tira (ponto 5.2) na tina cheia do eluente A (ponto 5.1) e cromatografar até que este tenha percorrido 35 cm (cerca de 15 horas).

5.4. Repetir as operações descritas nos pontos 5.2 e 5.3 com papel para cromatografia (Whatman nº 4 ou equivalente) (ponto 3.1) e o eluente B (ponto 2.3). Cromatografar até que este tenha percorrido 35 cm (cerca de 5 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 (ponto 2.4) e logo a seguir o reagente B (ponto 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 (ponto 2.6) sobre os cromatogramas obtidos no ponto 5.6.1. Aparecem manchas cinzento azuladas que indicam a presença de bromatos.

5.7. Nas condições indicadas acima para os eluentes A (ponto 2.2) e B (ponto 2.3) os valores R_f das soluções de referência (ponto 2.1) são os seguintes:

	<i>Eluente A</i> (ponto 2.2)	<i>Eluente B</i> (ponto 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 por formação do peróxido de hidrogénio após a acidificação da amostra (Título A, ponto 4.2.),
- por outro lado, por identificação de iões de bário.

Na ausência de persulfatos (Título A): junta-se ácido sulfúrico diluído a uma parte da solução de amostra ácida (Título B, ponto 4.1.), o que leva à formação dum precipitado branco de sulfato de bário. A presença de iões na solução de amostra (ponto 4.1.) é confirmada por cromatografia em papel como referido no ponto 5 mais adiante.

No caso de presença simultânea de peróxido de bário e de persulfatos (Título B, ponto 4.2.) após fusão alcalina do produto insolúvel e dissolução no ácido clorídrico, estabelece-se a presença de ião de bário por cromatografia e/ou por precipitação no estado 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 ($\text{Ba Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 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, V)
- 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 e Schüll 2043 b ou equivalente). Colocar durante uma noite na tina para cromatografia (Título A, ponto 3.5.), contendo o eluente (Título B, ponto 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

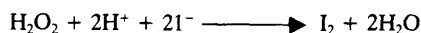
- 4.1.1. Homogeneizar ou dissolver 2 g do produto em 50 ml de água e, por meio de ácido clorídrico (Título B, ponto 2.3.) levar o pH da solução a 1 aproximadamente.

- 4.1.2. Transferir a solução (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 ponto 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, ponto 2.7.), misturar e dissolver a mistura num cadinho de platina (Título B, ponto 3.2.) durante cerca de meia hora.
- 4.2.3. Arrefecer à temperatura ambiente, suspender em 50 ml de água o produto da fusão e filtrar (Título B, ponto 3.5.).
- 4.2.4. Dissolver no ácido clorídrico 6 N (Título B, ponto 2.3.) e completar 100 ml com água. Utilizar esta solução para efectuar a cromatografia em papel descrita no ponto 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 (Título B, ponto 2.9.) e saturar a tina durante 15 horas, pelo menos.
- 5.2. Numa folha de papel para cromatografia, anteriormente tratada como acima indicado (Título B, ponto 3.4.), aplicar respectivamente, em três pontos, 5 µl de cada uma das soluções preparadas (Título B, ponto 4.1.2.) e (Título B, ponto 4.2.4.) e da solução de referência (Título B, ponto 2.8.).
- 5.3. Evaporar o solvente ao ar e cromatografar 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 o reagente (Título B, ponto 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 duma 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 imediatamente antes de usar.
- 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 50ml
- 4.3. Balões aferidos de 250 ml
- 4.4. Provetas graduadas de 25 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 duma pequena quantidade de água, completar o volume com água e misturar.
- 5.2. Pipetar 10 ml da solução da amostra (ponto 5.1.) para um balão de 250 ml (ponto 4.6) e adicionar sucessivamente 100 ml de ácido sulfúrico 2 N (ponto 3.1.), 20 ml de solução de iodeto de potássio (ponto 3.5.) e três gotas de solução de amónio (ponto 3.6).
- 5.3. Titular imediatamente o iodo formado com a solução de tiossulfato de sódio 0,1 N (ponto 3.4.) e, na proximidade do ponto de equivalência, juntar alguns ml de solução de amido como indicador. Anotar em ml a quantidade de tiossulfato de sódio 0,1 N utilizada (V).
- 5.4. Conforme o processo indicado nos pontos 5.2 e 5.3, efectuar um ensaio em branco, substituindo os 10 ml da solução da amostra por 10 ml de água. Anotar em ml a quantidade de tiossulfato de sódio 0,1 N utilizada (Vo).

6. CÁLCULO

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

$$\% \text{ de peróxido de hidrogénio} = \frac{(V - V_o) \times 1,7008 \times 250 \times 100}{m \times 10 \times 1000}$$

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

em que:

m = a quantidade em g de produto examinado (ponto 5.1.),

Vo = a quantidade em ml de solução de tiossulfato 0,1 N consumida no ensaio em branco (ponto 5.4.),

V = a quantidade em ml de solução de tiossulfato 0,1 N consumida no doseamento da solução de amostra (ponto 5.3.).

7. REPRODUTIBILIDADE ⁽¹⁾

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

⁽¹⁾ Segundo a norma ISO 5725.

II. IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO SEMIQUANTITATIVO DE CERTOS CORANTES DE OXIDAÇÃO NAS TINTURAS CAPILARES

1. OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Este método permite a identificação e o doseamento semiquantitativo das substâncias seguintes nas tinturas capilares sob forma de creme e de líquido:

Denominação das substâncias	Símbolo
<i>diaminobenzenos</i>	
1,2-diaminobenzeno (o.-fenilenodiamina)	(OPD)
1,3-diaminobenzeno (m.-fenilenodiamina)	(MPD)
1,4-diaminobenzeno (p.-fenilenodiamina)	(PPD)
<i>diaminotoluenos</i>	
3,4-diaminotolueno (o.-toluilonodiamina)	(OTD)
2,4-diaminotolueno (m.-toluilonodiamina)	(MTD)
2,5-diaminotolueno (p.-toluilonodiamina)	(PTD)
<i>diaminofenóis</i>	
2,4-diaminofenol	(DAP)
<i>hidroquinona</i>	
1,4-dihidroxibenzeno	(H)
<i>α-naftol</i>	(αN)
<i>Pirogalhol</i>	
1,2,3-trihidroxibenzeno	(P)
<i>Resorcina</i>	
1,3-dihidroxibenzeno	(R)

2. PRINCÍPIO

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

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

3. REAGENTES

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

3.1. Etanol absoluto

3.2. Acetona

3.3. Etanol 96° (v/v)

3.4. Amoníaco a 25 % ($d_{4}^{20} = 0,91$)

- 3.5. Ácido ascórbico L(+)
- 3.6. Clorofórmio
- 3.7. Cicloexano
- 3.8. Azoto normal
- 3.9. Tolueno
- 3.10. Benzeno
- 3.11. 1-Butanol
- 3.12. 2-Butanol
- 3.13. Ácido hipofosforoso a 50 %
- 3.14. Reagente diazótico: poder-se-á utilizar ou:
- clorobenzenossulfonato de 4-nitro-1-benzenodiazónio (sob a forma de sal estabilizado) como por exemplo vermelho 2 jN de Francolor,
 - naftaleno benzoato de 2-cloro-4-nitro-1-benzenodiazónio (sob a forma de sal estabilizado) como por exemplo reagente NNCD — Ref. n.º 74150 de FLUKA
- 3.15. Nitrato de prata
- 3.16. p-dimetilaminobenzaldeído
- 3.17. 2,5-dimetilfenol
- 3.18. Cloreto férrico hexaidratado
- 3.19. Ácido clorídrico a 10 % (m/v)
- 3.20. **Substâncias de referência**
As substâncias de referência são as indicadas no Título I «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 (ponto 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 % (ponto 3.3.).
Juntar 250 mg de ácido ascórbico (ponto 3.5.).
Alcalinizar com a ajuda da solução amoniacal (ponto 3.4.) até pH¹⁰, aparente.
Completar 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, a quando da adição do ácido ascórbico e do amoníaco, pode produzir-se um precipitado. Convém então deixar depositar antes de efectuar a tomada de ensaio.

- 3.22. **Eluente**
- 3.22.1. Acetona/clorofórmio/tolueno: 35:25:40 (v/v)
- 3.22.2. Clorofórmio/ciclohexano/etanol absoluto/amoníaco a 25 % 80:10:10:1 (v/v)
- 3.22.3. Benzeno/butanol secundário/água: 50:25:25 (v/v). Agitar bem a mistura e tomar a fase superior após decantação à temperatura do laboratório (entre 20 e 25° C).
- 3.22.4. 1-Butanol/clorofórmio e reagente M: 7:70:23 (v/v). Deixar decantar cuidadosamente à temperatura ambiente 20–25° C e tomar a fase inferior.

Preparação do reagente M

Solução de amónio a 25 % (v/v) (ponto 3.4.)	24 volumes
Ácido hipofosforoso a 50 % (ponto 3.13.)	1 volume
Água	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 (ponto 3.14.) escolhido. Esta solução deve ser preparada no momento da utilização.

3.23.2. *Reagente de Ehrlich*

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

3.23.3. *2,5-dimetilfenol/cloreto férrico hexaidratado**Solução 1:*

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

Solução 2:

dissolver 4 g de cloreto férrico hexaidratado (ponto 3.18.) em 100 ml de etanol a 96° (ponto 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 (ponto 3.15.) juntar amoníaco a 25 % (ponto 3.4.) até à dissolução do precipitado. Este reagente será preparado no momento da sua utilização. Não conservar.

4. **APARELHAGEM**

4.1. Equipamento de laboratório para cromatografia em camada delgada.

4.1.1. Recipiente em plástico ou em 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 em 0,2 µl com uma agulha de secção chata 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 «pre-coated», com a espessura de 0,25 mm e as dimensões de 20 x 20 cm (Macherey e Nagel Sílica G-HR ou equivalente).

4.2. Centrífuga permitindo 4000 rotações/minuto.

4.3. Tubos de centrífuga de 10 ml, fechados.

5. **TÉCNICA:**5.1. **Tratamento das amostras**

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

Num tubo de centrífuga (ponto 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 amoníaco (ponto 3.4.) se o pH for inferior a 10 e completar 10 ml com etanol 96° (ponto 3.3.).

Homogeneizar em atmosfera de azoto, tapar, e centrifugar a 4000 rotações/minuto durante 10 minutos.

Utilizar a solução sobrenadante.

5.2. Cromatografia**5.2.1. Aplicação**

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

1	2	3	4	5	6	7	8	9
R	P	H	PPD	DAP	PTD	OPD	OTD	MPD
MTD	α N							

Por outro lado, colocar sobre cada um dos décimo e décimo-primeiro pontos 2 μ l das soluções das amostras obtidas no ponto 5.1.

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

5.2.2. Desenvolvimento

Introduzir a placa numa tina previamente purgada com azoto, saturada com um dos 4 eluentes adequados (ponto 3.22.) e deixar desenvolver à temperatura ambiente (20 a 25°) 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 4 reveladores referidos no ponto 3.23.

5.2.4. Identificação

Comparam-se os Rf e as colorações obtidas com 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 semi-quantitativo

Comparar visualmente a intensidade das manchas correspondentes a cada substância identificada no ponto 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 1

Valores de Rf e colorações obtidas imediatamente após a revelação

Produtos de referência (3.20)	Eluentes				Reveladores			
	Rf				Colorações			
	3.22.1.	3.22.2.	3.22.3.	3.22.4.	Reagente diazótico (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.)
OPD	0,62	0,60	0,30	0,57	Castanho fraco	—	—	Castanho fraco
MPD	0,40	0,60	0,47	0,48	Castanho violáceo (*)	Amarelo	Castanho fraco	Castanho fraco
PPD	0,20	0,50	0,30	0,48	Castanho	Vermelho vivo (*)	Violeta	Cinzeno
OTD	0,60	0,60	0,53	0,60	Castanho (*)	Laranja fraco	Castanho fraco	Castanho acinentado
MTD	0,40	0,67	0,45	0,60	Castanho avermelhado (*)	Amarelo	Castanho	Negro
PTD	0,33	0,65	0,37	0,70	Castanho	Alaranjado	Violeta (*)	Cinzeno
DAP	0,07	—	0	0,05	Castanho (*)	Alaranjado	Violeta	Castanho
H	0,50	0,35	0,80	0,20	—	Alaranjado	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 fraco	Castanho muito fraco	Castanho (*)
R	0,50	0,37	0,80	0,17	Alaranjado (*)	Violeta fraco	Castanho muito fraco	Castanho fraco

Notas: 1. Se o OPD é fracamente revelado, deve utilizar-se o eluente (ponto 3.22.3.) para o separar nitidamente do OTD.

2. (*) indica a melhor revelação.

6. ANÁLISE POR CROMATOGRAPHIA EM CAMADA FINA BIDIMENSIONAL

A cromatografia em camada fina bidimensional aqui descrita necessita de recurso aos reagentes seguintes:

6.1. Substâncias e soluções de referência

6.1.1. β -naftol (β -N).

6.1.2. 2-aminofenol (OAP).

6.1.3. 3-aminofenol (MAP).

6.1.4. 4-aminofenol (PAP).

6.1.5. 2-nitro-*p*-fenilenediamina (2 NPPD).

6.1.6. 4-nitro-*o*-fenilenediamina (4 NOPD).

Preparar uma solução a 0,5 % (m/v) de cada uma das substâncias de referência suplementares como indicado no ponto 3.2.1.

6.2. Eluente

6.2.1. Acetato de etil-ciclohexano-amoníaco a 25 % (65-35-0,5, v).

6.3. Revelador

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

6.4. Cromatografia

- 6.4.1. Traçar como se indica na figura 1, duas linhas sobre a camada de adsorvente numa placa para cromatografia em camada fina (ponto 4.1.3.).
- 6.4.2. Colocar, em atmosfera de azoto, no ponto de partida 1 (figura 1) 1 a 4 μ l de extracto (ponto 5.1.). A quantidade depende da intensidade das manchas obtidas no cromatograma (ponto 5.2.).
- 6.4.3. Aplicar, divididos entre os pontos 2 e 3 (figura 1), os corantes de oxidação identificados (ou supostamente identificados) no ponto 5.2. Distância entre os pontos de aplicação: 1,5 cm. Aplicar 2 μ l de cada uma das soluções de referência, com a excepção do DAP, do qual é necessário colocar 6 μ l. Conduzir a operação em atmosfera de azoto.
- 6.4.4. Recomeçar a operação descrita no ponto 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 (ponto 3.22.2.). Colocar a placa (ponto 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 (ponto 4.1.) purgada com azoto, para evaporar os restos de eluente (durante, pelo menos, 60 minutos).
- 6.4.7. Introduzir, com uma proveta graduada, uma quantidade adequada de eluente (ponto 6.2.1.) numa tina purgada com azoto, colocar a placa rodada e 90° relativamente à primeira direcção de eluição (ponto 6.4.6.) na tina e cromatografar na segunda direcção na obscuridade até que o eluente tenha atingido a linha traçada na camada adsorvente. Tirar a placa e evaporar o eluente ao ar.
- 6.4.8. Na tina do cromatógrafo, expor a placa durante 10 minutos, aos vapores de iodo (ponto 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 ponto 6.4.8. pode ser confirmada de modo indubitável, recomeçando as operações descritas nos pontos 6.4.1. a 6.4.8., inclusive, admitindo a adição no ponto de partida 1, além da quantidade de extracto prescrita no ponto 6.4.2., de 1 μ l das substâncias de referência identificadas no ponto 6.4.8.

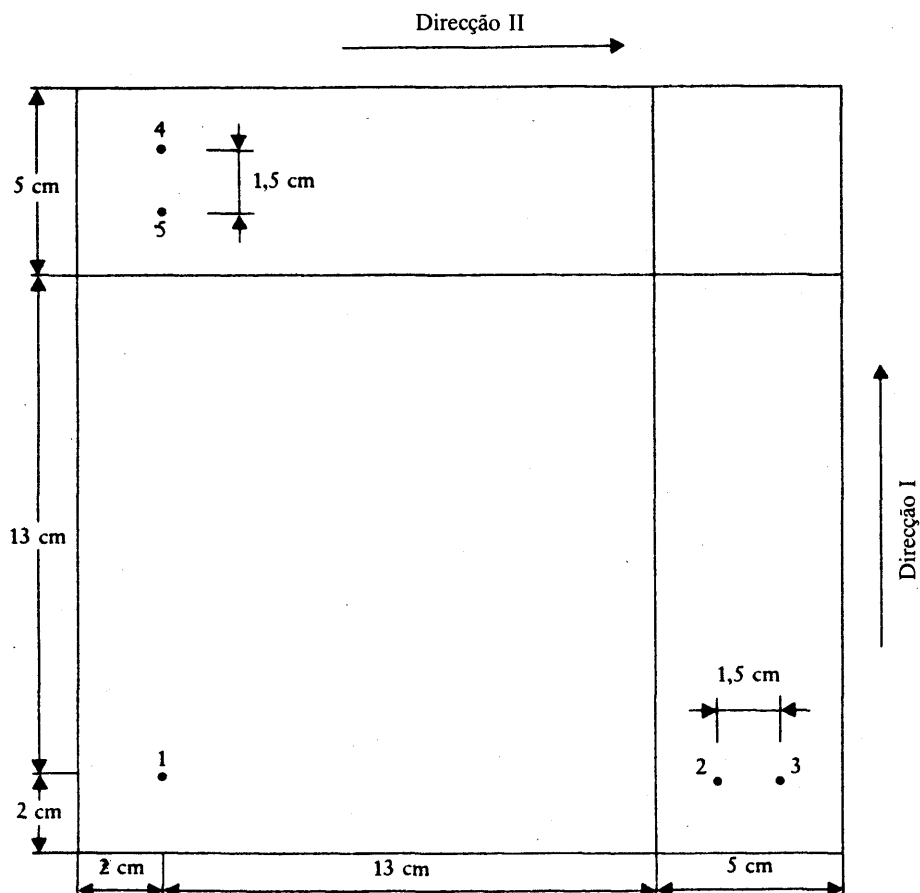
Se não for encontrada qualquer outra mancha, a primitiva interpretação do cromatograma é exacta.

QUADRO II

Côr das substâncias de referência após cromatografia e revelação pelos vapores de iodo

Substâncias de referência	Côr após revelação pelos vapores de iodo
R	Beje
P	Castanho
α -N	Violeta
β -N	Castanho claro
H	Violeta acastanhado
MPD	Amarelo acastanhado
PPD	Violeta acastanhado
MTD	Castanho escuro
PTD	Amarelo acastanhado
DAP	Castanho escuro
AOP	Laranja
MAP	Amarelo acastanhado
PAP	Violeta acastanhado
2-NPPD	Castanho
4-NOPD	Laranja

Figura 1



III. IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DOS NITRITOS

A. IDENTIFICAÇÃO

1. OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Este método é conveniente para a identificação dos nitritos nos produtos cosméticos.

Aplica-se em particular aos cremes, aos produtos pastosos e aos dentífricos.

2. PRINCÍPIO

A caracterização dos nitritos faz-se com a ajuda da fenil-hidrazona de 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 de 2-aminobenzaldeído (reagente «nitrina» R) em metanol.

Pesar 2 g de Nitrina R e introduzi-los em balão aferido de 100 ml. Juntar, gota a gota, 4 ml de ácido clorídrico diluído (ponto 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 (ponto 4.3.).

4. APARELHAGEM

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 com 10 x 10 cm.

4.5. Espátula de material sintético.

4.6. Papel de filtro com 10 x 10 cm.

5. TÉCNICA

5.1. Estender uniformemente uma parte da amostra a examinar sobre a placa de vidro (ponto 4.4.), procurando que a espessura da camada não ultrapasse 1 cm.

5.2. Mergulhar uma folha de papel filtro (ponto 4.6.) em água destilada e colocá-la sobre a amostra, aplicando-a convenientemente com a ajuda da espátula (ponto 4.5.).

5.3. Esperar cerca de 1 minuto e colocar no meio do papel de filtro:

— 2 gotas de ácido sulfúrico diluído (ponto 3.1.), seguidamente

— 2 gotas da solução de Nitrina R (ponto 3.4.).

5.4. Passados 5 a 10 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 5 a 15 segundos. Esta viragem não se verifica senão passados um a dois minutos em presença de quantidades mais 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 da massa de nitrito de sódio.

3. PRINCÍPIO

Após diluição e clarificação da amostra, efectua-se uma reacção colorimétrica com a N (α -naftil-etilenodiamina) e a intensidade da coloração obtida é determinada em 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. Reagentes I (Carrez I): dissolver 106 g de cianoferrato (II) de potássio $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ em água destilada e completar 1 000 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 1 000 ml.

4.2. Solução de nitrito de sódio: num balão aferido de 1 000 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 μg de $NaNO_2$.

4.3. Solução de hidróxido de sódio 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 1 000 ml.

4.5. Ácido clorídrico 5 N.

4.6. Reagente de N-(α -naftilo): esta solução deverá ser preparada no próprio dia da sua utilização. Dissolver 0,1 g de dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina em água e completar a 100 ml.

5. APELHAGEM

5.1. Balança analítica.

5.2. Balões aferidos de 100, 250, 500 e 1 000 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, 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 (ponto 4.1.1.) e 2 ml do reagente Carrez II (ponto 4.1.2.).
- 6.3. Ajustar o pH a 8,3 no potenciómetro, com uma solução de hidróxido de sódio 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 (ponto 5.5.).
- 6.5. Pipetar uma quantidade conveniente (V ml) do filtrado límpido, não ultrapassando 25 ml, para um balão aferido de 100 ml; diluir com água destilada até 60 ml.
- 6.6. Misturar, adicionar 10,0 ml de cloridrato de sulfanilamida (ponto 4.4.), e depois 6,0 ml de ácido clorídrico 5 N (ponto 4.5.). Misturar e deixar repousar durante 5 minutos. Juntar 2,0 ml do reagente N(-naftil) (ponto 4.6.), misturar e deixar repousar durante 3 minutos. Completar 100 ml e misturar.
- 6.7. Preparar um ensaio em branco, repetindo as operações efectuadas nos pontos 6.5. e 6.6. sem adição do reagente N(-1-naftilo) (ponto 4.6.).
- 6.8. Determinar (ponto 5.7.) a densidade óptica em 538 nm da solução da amostra (ponto 6.6.) em relação à solução correspondente ao ensaio em branco (ponto 6.7.).
- 6.9. Ler na curva de aferição (ponto 6.10.) o teor em nitrito de sódio, em μg por 100 ml de solução (ml) correspondente à densidade óptica determinada com a amostra (ponto 6.8.).
- 6.10. Curva de aferição. Preparar com a ajuda da solução de nitrito de sódio (ponto 4.2.) uma curva de aferição na gama de 0-20-40-60-80-100 μg de nitrito de sódio por 100 ml.

7. CÁLCULO

Calcular o teor em nitrito de sódio da amostra, em percentagem, pela fórmula seguinte:

$$\% \text{NaNO}_2 = \frac{250}{V} \times m_1 \times 10^{-6} \times \frac{100}{m} = \frac{m_1}{V \times m \times 40}$$

em que:

m = a massa em g da amostra submetida à análise (ponto 6.1),

m₁ = o teor em nitrito de sódio em microgramas, determinado de acordo com as indicações do ponto 6.9.,

V = o número de ml de filtrado utilizados para a determinação (ponto 6.5.)

8. REPRODUTIBILIDADE⁽⁴⁾

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

IV. IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DO FORMALDEÍDO LIVRE

1. OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

O método descreve a identificação e o doseamento do formaldeído livre.

É aplicável a todos os produtos cosméticos e compreende três partes:

1.1. Identificação.

1.2. Doseamento por colorimetria com acetilacetona:

Este método não se aplica quando o formaldeído é combinado ou polimerizado, no caso dos libertadores de formol;

Se o resultado ultrapassar a concentração máxima autorizada no produto terminado, utiliza-se o método seguinte.

1.3. Doseamento com bissulfito:

Evita que se tome em consideração o formaldeído combinado ou polimerizado no caso dos libertadores de formol;

Porém, são doseáveis certas combinações lábeis (a hexametilenotetramina, por exemplo). Contudo, em presença da solução tampão, a determinação de alcalinidade é difícil.

2. DEFINIÇÃO

O teor da amostra em formaldeído livre determinado por este método, é expresso em percentagem de formaldeído.

3. PRINCÍPIO

3.1. Parte I

O formaldeído em meio sulfúrico confere uma coloração rosada ou malva em presença do reagente de Schiff.

3.2. Parte II

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

⁽⁴⁾ Segundo a norma ISO 5725.

3.3. Parte III

O formaldeído reage com o sulfito em meio ácido a 0° C para formar um composto de adição. Os protões em excesso são titulados pelo hidróxido de sódio. Os protões consumidos constituem a base de cálculo para determinar a quantidade de formaldeído. Um ensaio em branco sem sulfito permite determinar a alcalinidade ou a acidez do meio.

4. REAGENTES

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

4.1. Ácido acético concentrado.**4.2. Acetato de amónio anidro.****4.3. 1-Butanol.****4.4. Ácido sulfúrico 2 N, aproximadamente.****4.5. Solução de sulfito de sódio 0,1 M recentemente preparada.****4.6. Reagente de Schiff**

Num copo, pesar 100 mg de fucsina; dissolvê-los em 75 ml de água a 80° C.

Depois de arrefecidos, acrescentar 2,5 g de sulfito de sódio hexaidratado $7 \text{ H}_2\text{O}$ e 1,5 ml de ácido clorídrico concentrado ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot \text{V}$) ($d_4^{20} = 1,19$). Completar a 100 ml (duração de conservação 2 semanas).

4.7. Reagente de acetilacetona

Num balão aferido de 1 000 ml, dissolver:

150 g de acetato de amónio;

2 ml de acetilacetona recentemente destilada a pressão reduzida e que não deve apresentar qualquer absorção a 410 nm;

3 ml de ácido acético concentrado.

Completar a 1 000 ml com água (pH de solução igual a cerca de 6,4). Este reagente deve ser recentemente preparado.

4.8. Solução titulada de ácido sulfúrico 0,1 N.**4.9. Solução titulada de hidróxido de sódio 0,1 N.****4.10. Solução titulada de iodo 0,1 N.****4.11. Solução titulada de tiosulfato de sódio 0,1 N.****4.12. Formaldeído padrão: solução-mãe**

Num balão aferido de 1 000 ml, introduzir 5 g de formol doseado entre 37 a 40 % de formaldeído e completar 1 000 ml.

Determinação do título da solução-mãe.

Tomar 10,00 ml, adicionar 25,00 ml de solução titulada de iodo 0,1N e 10 ml de solução de hidróxido de sódio N.

Deixar repousar 5 minutos.

Acidificar com 11 ml de HCL N e dosear o iodo em excesso com uma solução titulada de tiosulfato de sódio 0,1 N, em presença de cozimento de amido como indicador.

1 ml de solução de iodo 0,1 N consumido corresponde a 1,5 mg de formaldeído.

4.13. Formaldeído padrão: solução diluída

Efectuar sucessivamente uma diluição de 1/20, depois uma diluição a 1/100 da solução-mãe em água desmineralizada.

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

4.14. Solução de timolftaleína

0,1 g por 100 ml, em etanol a 50 % v/v.

4.15. Reagente (ponto 4.7.) sem acetilacetona.

5. APARELHAGEM

- 5.1. Material corrente de laboratório.
- 5.2. Filtro «separador de fase» ref. Whatman 1 PS (ou equivalente).
- 5.3. Centrífuga.
- 5.4. Espectrofotómetro.
- 5.5. Tinas de vidro de 1 cm de percurso óptico.
- 5.6. Potenciómetro com registador.
- 5.7. Eléctrodos de vidro/calomelanos (é aconselhável utilizar eléctrodos especiais de baixa temperatura).

6. TÉCNICA

6.1. Identificação

- 6.1.1. Num copo de 10 ml introduzir cerca de 2 g de amostra.
- 6.1.2. Juntar 2 gotas de $\text{H}_2\text{SO}_4 2\text{N}$ (ponto 4.4.) e 2 ml de reagente de Schiff (ponto 4.6.). (Este reagente deve estar rigorosamente incolor no momento da utilização).
Agitar e deixar em contacto 5 minutos.
- 6.1.3. Se, em 5 minutos, se observar uma coloração rosa ou malva, a quantidade de formaldeído presente é superior a 0,01 %. Efectuar então o doseamento segundo a técnica do ponto 6.2. e, se necessário, do ponto 6.3.

6.2. Doseamento colorimétrico com acetilacetona.

6.2.1. Solução da amostra

- 6.2.1.1. Num balão aferido de 100 ml pesar cerca de 0,001 g de massa de amostra em ensaio (em g) correspondente a uma quantidade pressuposta equivalente a cerca de 150 μg de formaldeído.
- 6.2.1.2. Completar 100 ml com água e misturar (solução S).
- 6.2.1.3. Introduzir num matrás:
10,00 ml de solução S, 5,00 ml de reagente de acetilacetona (ponto 4.7.); água desmineralizada até ao volume de 30 ml.

6.2.2. Solução-padrão

A interferência eventual duma coloração de fundo na amostra em ensaio é eliminada da seguinte maneira:

Num matrás de 50 ml introduzir: 10,0 ml de solução S; 5,0 ml de reagente (ponto 4.15.); água desmineralizada até ao volume de 30 ml.

6.2.3. *Ensaio em branco*

Num matrás juntar: 5,0 ml de reagente de acetilacetona (ponto 4.7.); água desmineralizada até ao volume de 30 ml.

6.2.4. *Doseamento*

6.2.4.1. Agitar as misturas preparadas nos pontos 6.2.1.3., 6.2.2. e 6.2.3.

Mergulhar os matrases num banho-maria a 60° C durante exactamente 10 minutos.

Arrefecer durante 2 minutos num banho de água com gelo.

6.2.4.2. Transferir para uma ampola de decantação, 50 ml contendo 10 ml de 1-butanol (ponto 4.3.). Lavar com 3 a 5 ml de água.

Agitar fortemente a mistura durante 30 segundos exactos. Deixar decantar.

6.2.4.3. Filtrar por filtro «separador de fase» (ponto 5.2.) para as tinas do espectrofotómetro.

Pode também recorrer-se a uma centrifugação (5 000 rotações/minuto durante 5 minutos).

6.2.4.4. Determinar a densidade óptica A_1 a 410 nm do extracto da solução da amostra obtida no ponto 6.2.1.3., contra o extracto da solução padrão do ponto 6.2.2.

6.2.4.5. Da mesma maneira determinar a densidade óptica do ensaio em branco, obtido no ponto 6.2.3., contra 1-butanol (A_2).

NB: Todas estas operações devem ser executadas num espaço de tempo de 25 minutos a partir do momento em que o matrás é colocado no banho-maria a 60° C.

6.2.5. *Curva de aferição*

6.2.5.1. Num matrás de 50 ml introduzir:

5,00 ml de solução padrão diluída (ponto 4.13.); 5,00 ml de reagente de acetilacetona (ponto 4.7.); água desmineralizada até ao volume final de 30 ml.

6.2.5.2. Continuar segundo as indicações do ponto 6.2.4.5. e determinar a densidade óptica em relação ao 1-butanol (ponto 4.3.).

6.2.5.3. Repetir o processo com 10, 15, 20, 25 ml de solução padrão diluída (ponto 4.13.).

6.2.5.4. Para obter o valor do ponto O (correspondente à colocação dos reagentes) proceder como no ponto 6.2.4.5.

6.2.5.5. Construir a curva de aferição após subtracção do valor do ponto O de cada uma das densidades ópticas obtidas nos pontos em 6.2.5.1. e 6.2.5.3.

A lei de Beer é cumprida até 30 μ g de formaldeído.

6.3. **Doseamento em bissulfito**

6.3.1. *Tomada de ensaio*

6.3.1.1. Para o ensaio:

Num copo tarado, pesar cerca de 0,001 g de amostra (m gramas) correspondente a uma quantidade admitida de formaldeído, compreendida entre 3 e 20 mg.

6.3.1.2. Para o ensaio padrão:

Num copo tarado pesar, com a precisão de cerca de 0,001 g, uma quantidade equivalente de amostra (m' gramas).

6.3.2. *Doseamento*

6.3.2.1. Introduzir 50,00 ml de Na_2SO_3 0,1 M (ponto 4.5.) num copo de 100 ml e juntar 10,00 ml de H_2SO_4 0,1 N (ponto 4.8). Agitar.

6.3.2.2. Introduzir o copo numa mistura de gelo e sal, a fim de levar a temperatura da solução do ponto 6.3.2.1. a $+ 2^\circ \text{C}$. Introduzir quantitativamente a tomada de ensaio m (ponto 6.3.1.1.).

6.3.2.3. Dosear rapidamente por potenciometria com NaOH 0,1 N (ponto 4.9.), agitando continuamente e mantendo a temperatura entre $+ 2^\circ \text{e} + 4^\circ \text{C}$ (a zona de neutralização situa-se entre pH de 9 a 11). Seja V_1 o volume de NaOH 0,1 N (ponto 4.9.) utilizado.

6.3.3. *Ensaio em branco*

Titular a solução do ponto 6.3.2.1. nas condições descritas no ponto 6.3.2. Seja V_2 o volume de NaOH 0,1 N (ponto 4.9.) utilizado.

6.3.4. *Ensaio padrão*

Determinar a acidez ou a alcalinidade da amostra por doseamento potenciométrico com NaOH 0,1 N (ponto 4.9.) ou H_2SO_4 0,1 N (ponto 4.8.) sobre a tomada de ensaio m' (ponto 6.3.1.2.).

Seja v' o volume de NaOH 0,1 N ou de H_2SO_4 0,1 N utilizado. v' pode ser igual a 0.

6.3.5. *Nota*

É importante respeitar rigorosamente as condições operatórias. É possível efectuar o doseamento em presença de timolftaleína (ponto 4.14.) como indicador.

7. **CÁLCULOS**7.1. **Doseamento colorimétrico com acetilacetona**

7.1.1. Subtrair A_2 de A_1 e ler sobre a curva de aferição (ponto 6.2.5.5.) a quantidade C, expressa em microgramas de formaldeído contido na solução do ponto 6.2.1.1.

7.1.2. O teor em formaldeído da amostra (% m/m) é calculado segundo a fórmula:

$$\text{formaldeído \%} = \frac{C}{10^3 \times m}$$

7.2. **Doseamento com bissulfito**

Relacionar a massa m com o volume de NaOH 0,1 N ou de H_2SO_4 0,1 N utilizado no ensaio padrão (ponto 6.3.4.) segundo a fórmula:

$$v = \frac{v' \times m}{m'}$$

Para productos neutros $V = 0$.

7.2.1. Caso dum produto ácido:

$$\% \text{ HCHO} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 + v)}{m}$$

7.2.2. Caso dum produto alcalino:

$$\% \text{ HCHO} = \frac{0,30 (V_2 - V_1 - v)}{m}$$

7.3. Se houver divergência entre os resultados dos 2 métodos, apenas o resultado mais baixo deve ser tomado em consideração.

8. REPRODUTIBILIDADE ⁽⁴⁾

Para um teor em formaldeído de 0,2 %, a diferença entre os resultados de 2 doseamentos paralelos efectuados na mesma amostra não deve ultrapassar: 0,005 % para o doseamento colorimétrico com acetilacetona e 0,05 % para o doseamento com bissulfito.

V. DOSEAMENTO DE RESORCINOL NOS CHAMPÔS E NAS LOÇÕES CAPILARES

1. OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Este método descreve o doseamento de resorcinol nos champôs e loções capilares por cromatografia em fase gasosa.

Aplica-se a concentrações de 0,1 a 2,0 % do produto.

2. DEFINIÇÃO

O teor em resorcinol determinado por este método é expresso em percentagem de resorcinol.

3. PRINCÍPIO

A resorcina e o 3,5-diidroxitolueno, 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, sililados 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, prontas para utilizar e desactivadas.

Proceder da forma seguinte: vaporizar com água as placas de sílica até que se tornem brilhantes. Secá-las à temperatura ambiente durante 1 a 3 horas.

NB: Se as placas não forem desactivadas, pode haver perdas de resorcinol por adsorção irreversível sobre a sílica.

4.5. Eluente: acetona/clorofórmio/ácido acético (20:75:5 v).

4.6. Solução padrão de resorcinol; dissolver 400 mg de resorcinol em 100 ml de etanol a 96 % (1 ml corresponde a 4 000 µg de resorcinol).

4.7. Solução do padrão interno; dissolver 400 mg de 3,5-diidroxitolueno (DHT) em 100 ml de etanol a 96 % (1 ml corresponde a 4 000 µg de DHT).

4.8. Mistura padrão: misturar 10 ml de solução do ponto 4.6. e 10 ml de solução do ponto 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⁾ Segundo a norma ISO 5725.

4.9. Reagentes de sililação

4.9.1. N, O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

4.9.2. Hexametildissilazano (HMDS).

4.9.3. Trimetilclorossilano (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 a 50 mg de resorcinol.

6.1.2. Acidificar com ácido clorídrico (ponto 4.1.) (cerca de 2 a 4 ml). Juntar 10 ml (40 mg de DHT) de padrão interno (ponto 4.7.) e misturar. Transferir para um balão aferido de 100 ml com a ajuda de etanol. Completar o volume com etanol (ponto 4.3.) e misturar).

6.1.3. Aplicar 250 µl da solução do ponto 6.1.2. numa placa de sílica desactivada (ponto 4.4.), sobre uma linha contínua com cerca de 8 cm de comprimento. Tomar cuidado para obter uma tira tão delgada quanto possível.

6.1.4. Colocar, separadamente e da mesma maneira (ponto 6.1.3.), na mesma placa, 250 µl de mistura padrão (ponto 4.8).

6.1.5. Sobre a linha de partida, aplicar 2 gotas de 5 µl da cada solução dos pontos 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 (ponto 4.5.) até que tenha percorrido 12 cm depois da linha de partida (45 minutos).

Secar a placa ao ar e localizar a zona resorcinol/DHT com luz UV de 254 nm. Os dois compostos têm aproximadamente o mesmo valor de R_f.

Destacar as tiras 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 maneira seguinte:

Juntar 2 ml de metanol (ponto 4.2.) e extrair durante 1 hora, agitando continuamente. Filtrar a mistura e repetir a extracção, durante 15 minutos, com 2 ml de metanol (ponto 4.2.).

6.1.8. Evaporar o diluente da totalidade dos extractos, colocando-os durante uma noite num exsiccador, a pressão reduzida, com um dessecante adequado. Não evaporar com calor.

6.1.9. Sililar os resíduos (ponto 6.1.8.) como indicado ou em 6.1.9.1. ou no ponto 6.1.9.2.

6.1.9.1. Juntar 200 µl de BSTFA (ponto 4.9.1.) e deixar a mistura num recipiente fechado à temperatura ambiente durante 12 horas.

6.1.9.2. Juntar sucessivamente 200 µl de HMDS (ponto 4.9.2.) e 100 µl de TMCS (ponto 4.9.3.) e aquecer a mistura durante 30 minutos a 60° C num recipiente fechado. Arrefecer.

6.2. Cromatografia em fase gasosa

6.2.1. *Técnica:*

A fase estacionária deve dar um grau de resolução igual ou superior a 1,5:

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

em que:

R_1 e R_2 = tempo de retenção expresso em minutos de 2 picos,

W_1 e W_2 = largura dos mesmos picos a meia-altura,

d' = Velocidade do papel em mm/minuto.

As condições operatórias seguintes permitem obter bom resultado:

coluna: aço inoxidável,
comprimento: 200 cm
diâmetro: 3 (1/8 ")
enchimento: 10 % OV 17 em cromossorbe WAW 100 — 120 mesh.

detector de ionização de chama

Temperaturas:

coluna: 185° C (isotérmico)
injector: 250° C
detector: 250° C

gaz 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 a 3 μ l das soluções obtidas no ponto 6.1.9. Fazer 5 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 em resorcina da amostra, expressa em percentagem, (% m/m) é dada por:

$$\% \text{ resorcionol} = \frac{4}{M} \times \frac{S_{\text{amostra}}}{S_{\text{mistura padrão}}}$$

em que:

M = tomada de ensaio em gramas (ponto 6.1.1.)

S_{amostra} = relação média obtida para os picos da solução amostra,

$S_{\text{mistura padrão}}$ = relação média obtida para os picos da mistura padrão segundo o ponto 6.2.2.

8. REPRODUTIBILIDADE⁽⁴⁾

Para um teor em resorcina de 0,5 % a diferença entre os resultados de 2 doseamentos paralelos realizados com a mesma amostra não deve ultrapassar 0,025 %.

VI. DOSEAMENTO DO METANOL EM RELAÇÃO AO ETANOL OU AO 2-PROPANOL

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 aerosóis). Aplica-se a concentrações relativas de 0 a 10 %.

2. DEFINIÇÃO

O teor em metanol determinado segundo este método é expresso em percentagem 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⁾ Segundo a norma ISO 5725.

4. REAGENTES

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 (2 ml, 20 ml, 0-1 ml)

5.4. Microseringas de 0 a 100 μ l e de 0 a 5 μ l.

Somente para as amostras de produtos em aerossóis, seringa especial para gaz, com válvula móvel (figura 5 do método de amostragem) ⁽¹⁾.

6. TÉCNICA

6.1. Preparação das amostras

6.1.1. Os produtos em aerossóis são tratados como indicado no capítulo II do anexo da Directiva da Comissão 80/1335/CEE de 22 de Dezembro 1980 ⁽¹⁾, e depois analisados por cromatografia em fase gasosa nas condições prescritas no ponto 6.2.1.

6.1.2. Os outros produtos, tratados como indicado no capítulo II acima referido, 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 prescritas no pontos 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 cromossorbe W AW 100-120 mesh e um detector catarométrico.

6.2.1.2. A fase estacionária deve dar um grau de resolução igual ou superior a 1,5:

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

em que:

R_1 e R_2 = tempo de retenção, expresso em minutos, de 2 picos,

W_1 e W_2 = largura dos mesmos picos a meia-altura,

d' = velocidade do papel em mm/minuto.

6.2.1.3. As condições seguintes permitem obter bons resultados:

Tipos de coluna:	aço inoxidável
comprimento:	3,5 m
diâmetro:	3 mm

⁽¹⁾ JO N° L 383 de 31. 12. 1980, p. 27.

corrente do detector catarométrico: 150 mA

Gaz de arrastamento: Hélio – pressão: 2,5 bars; Caudal: 45 ml/minuto

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 cromossorbe 105 ou com porapak QS e um detector de ionização de chama.

6.2.2.2. A fase estacionária deve dar um grau de resolução igual ou superior a 1,5:

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

em que:

R_1 e R_2 = tempos de retenção, expressos em minutos, de 2 picos,

W_1 e W_2 = largura dos mesmos picos a meia-altura,

d' = velocidade do papel em mm/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 $8 \cdot 10^{-10}$ A

gaz de arrastamento: azoto – pressão: 2,1 bars; caudal: 40 ml/minuto

auxiliar: hidrogénio – pressão: 1,5 bar; caudal: 20 ml/minuto

Temperaturas:

Injector: 150° C

Detector: 230° C

Coluna: 120° C ou 130° C

7. CURVAS PADRÕES

7.1. Nas condições prescritas no ponto 6.2.1 (coluna Hallcomid M 18), utilizar as misturas padrões definidas seguidamente. Preparar estas misturas por medição volumétrica, mas determinar a quantidade exacta libertada, pesando imediatamente após cada adição.

Concentração relativa % m/m	metanol ml	Etanol ml (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 a 3 μ l no cromatógrafo segundo as modalidades prescritas no ponto 6.2.1.

Calcular a relação 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 relação das áreas dos picos (metanol/etanol) ou (metanol/2-propanol).

- 7.2. Nas condições prescritas no ponto 6.2.2 (Porapak QS ou Cromossorbe 105) utilizar as misturas padrões definidas seguidamente. Preparar estas misturas por medida volumétrica, mas determinar a quantidade exacta libertada, pesando imediatamente após cada adição.

Concentração relativa % m/m	Metanol μ l	Etanol ml (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 a 3 μ l no cromatógrafo segundo as modalidades prescritas no ponto 6.2.2.

Calcular a relação 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 relação das áreas dos picos (metanol/etanol) ou (metanol/2-propanol).

- 7.3. Nos dois casos a curva de calibração deve ser uma recta.

8. REPRODUTIBILIDADE (+)

Para teores em metanol de 5 % em relação ao etanol ou ao 2-propanol, a diferença entre os resultados de 2 doseamentos paralelos efectuados sobre a mesma amostra não deve ultrapassar 0,25 %.

(+) Segundo a norma ISO 5725.