

**SÉTIMA DIRECTIVA 96/45/CE DA COMISSÃO**

de 2 de Julho de 1996

relativa aos métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 76/768/CEE do Conselho, de 27 de Julho de 1976, relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos produtos cosméticos<sup>(1)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 95/34/CE da Comissão<sup>(2)</sup>, e, nomeadamente, o nº 1 do seu artigo 8º,

Considerando que a Directiva 76/768/CEE prevê controlos oficiais dos produtos cosméticos, com o objectivo de verificar se são respeitadas as condições exigidas pelas disposições comunitárias relativas à composição de produtos cosméticos;

Considerando que convém estabelecer, o mais rapidamente possível, todos os métodos de análise necessários; que certos métodos foram já adoptados na Directiva 80/1335/CEE da Comissão<sup>(3)</sup>, alterada pela Directiva 87/143/CEE<sup>(4)</sup>, na Directiva 82/434/CEE da Comissão<sup>(5)</sup>, alterada pela Directiva 90/207/CEE<sup>(6)</sup>, e nas Directivas da Comissão 83/154/CEE<sup>(7)</sup>, 85/490/CEE<sup>(8)</sup>, 93/73/CEE<sup>(9)</sup> e 95/32/CE<sup>(10)</sup>;

Considerando que a identificação e a determinação de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo nos produtos cosméticos constituem uma sétima etapa;

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

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

*Artigo 1º*

Os Estados-membros tomarão as medidas necessárias para assegurar que, aquando dos controlos oficiais dos produtos

cosméticos, a identificação e a determinação de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo sejam efectuadas em conformidade com o método descrito no anexo.

*Artigo 2º*

1. Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para darem cumprimento ao disposto na presente directiva, o mais tardar, até 30 de Setembro de 1997. Desse facto informarão imediatamente a Comissão.

2. As disposições adoptadas pelos Estados-membros farão referência à presente directiva ou serão acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

3. Os Estados-membros comunicarão à Comissão o texto das disposições do direito interno que adoptarem no domínio regulado pela presente directiva.

*Artigo 3º*

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

*Artigo 4º*

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 2 de Julho de 1996.

*Pela Comissão*

Emma BONINO

*Membro da Comissão*

<sup>(1)</sup> JO nº L 262 de 27. 9. 1976, p. 169.

<sup>(2)</sup> JO nº L 167 de 18. 7. 1995, p. 19.

<sup>(3)</sup> JO nº L 383 de 31. 12. 1980, p. 27.

<sup>(4)</sup> JO nº L 57 de 27. 2. 1987, p. 56.

<sup>(5)</sup> JO nº L 185 de 30. 6. 1982, p. 1.

<sup>(6)</sup> JO nº L 108 de 28. 4. 1990, p. 92.

<sup>(7)</sup> JO nº L 291 de 24. 10. 1983, p. 9.

<sup>(8)</sup> JO nº L 295 de 7. 11. 1985, p. 30.

<sup>(9)</sup> JO nº L 231 de 14. 9. 1993, p. 34.

<sup>(10)</sup> JO nº L 178 de 28. 7. 1995, p. 20.

## ANEXO

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE 2-FENOXIETANOL, 1-FENOXI-2-PROPANOL, 4-HIDROXIBENZOATO DE METILO, 4-HIDROXIBENZOATO DE ETILO, 4-HIDROXIBENZOATO DE PROPIL, 4-HIDROXIBENZOATO DE BUTILO E 4-HIDROXIBENZOATO DE BENZIL EM PRODUTOS COSMÉTICOS**

## A. IDENTIFICAÇÃO

## 1. Objectivo e campo de aplicação

O presente método especifica um procedimento de cromatografia de camada fina que, combinado com o método de determinação descrito na parte B, permite identificar o 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzil em produtos cosméticos.

## 2. Princípio

Os conservantes são extraídos com acetona da amostra de cosmético acidificada. Após filtração, a solução de acetona é misturada com água e os ácidos gordos são precipitados num meio alcalino sob a forma de sais de cálcio. A mistura alcalina acetona/água é extraída com éter dietílico para retirar as substâncias lipofílicas. Após acidificação, extraem-se os conservantes com éter dietílico. Aplica-se uma fracção do extracto de éter dietílico sobre uma placa de camada fina revestida com gel de sílica. Após a revelação da placa, observa-se, com luz ultravioleta, o cromatograma obtido, que é visualizado com a ajuda de reagente de Millon.

## 3. Reagentes

## 3.1. Generalidades

Todos os reagentes utilizados devem ser de pureza analítica. Deve utilizar-se água destilada, ou água cuja pureza seja, no mínimo, igual.

## 3.2. Acetona.

## 3.3. Éter dietílico.

## 3.4. n-Pentano.

## 3.5. Metanol.

## 3.6. Ácido acético, glacial.

3.7. Solução de ácido clorídrico,  $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$ .3.8. Solução de hidróxido de potássio,  $c(\text{KOH}) = 4 \text{ mol/l}$ .3.9. Cloreto de cálcio bi-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

## 3.10. Revelador: reagente de Millon

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

## 3.11. 2-fenoxietanol.

## 3.12. 1-fenoxi-2-propanol.

## 3.13. 4-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno).

## 3.14. 4-hidroxibenzoato de etilo (etilparabeno).

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

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

## 3.17. 4-hidroxibenzoato de benzil (benzilparabeno).

## 3.18. Soluções de referência

Preparar soluções a 0,1 % (m/V) de cada uma das substâncias de referência 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 e 3.17 em metanol.

## 3.19. Solvente de revelação

Misturar 88 volumes de n-pentano com 12 volumes de ácido glacial acético.

#### 4. Aparelhos e utensílios

Material corrente de laboratório e

- 4.1. Banho de água, capaz de manter a temperatura a 60 °C,
- 4.2. Tina para revelação (não forrada com papel de filtro),
- 4.3. Fonte de luz ultravioleta, 254 nm,
- 4.4. Placas de camada fina, 20 cm × 20 cm, previamente revestidas com 0,25 mm de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>, com zona de concentração (Merck nº 11798, Darmstadt, ou equivalente),
- 4.5. Forno, capaz de manter temperaturas até 105 °C,
- 4.6. Secador de cabelo de ar quente,
- 4.7. Rolo de pintar, em lã, com aproximadamente 10 cm de comprimento e 3,5 cm de diâmetro externo. A espessura da camada de lã deverá ser de 2-3 mm. Desbastar a lã, se necessário.  
(Ver nota do ponto 5.2),
- 4.8. Tubos de ensaio de 50 ml com tampa de rosca,
- 4.9. Placa eléctrica de aquecimento, com controlador termostático da temperatura. Regulação da temperatura: aproximadamente 80 °C. A placa de aquecimento deve estar coberta com uma placa de alumínio de 20 cm × 20 cm e com uma espessura de, aproximadamente, 6 mm, a fim de proporcionar uma distribuição uniforme do calor.

#### 5. Técnica

##### 5.1. Preparação das amostras

Pesar cerca de 1 g de amostra para um tubo de ensaio de 50 ml com tampa de rosca. Adicionar 4 gotas de solução de ácido clorídrico (3.7) e 40 ml de acetona.

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

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

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

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

##### 5.2. Cromatografia de camada fina (CCF)

Colocar uma placa de CCF (4.4) sobre uma placa de alumínio aquecida (4.9). Aplicar 10 µl de cada uma das soluções de referência (3.18) e 100 µl da ou das soluções da amostra (5.1) sobre uma linha de partida na zona de concentração da placa CCF.

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

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

Examinar a placa numa luz ultravioleta (4.3) e marcar a posição das manchas. Aquecer a placa durante 30 minutos num forno (4.5) a 100 °C, para retirar o ácido acético excedentário. Visualizar os conservantes no cromatograma com reagente de Millon (3.10), mergulhando o rolo de pintar (4.7) no reagente, passando o rolo sobre a placa CCF até ela se encontrar uniformemente humidificada.

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

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

**6. Identificação**

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

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

**7. Observações**

- 7.1. Devido à toxicidade do reagente de Millon, a melhor maneira de o aplicar é através de um dos procedimentos descritos. A vaporização não é recomendada.
- 7.2. Outros compostos contendo grupos hidróxilos podem também dar produtos corados por reacção com o reagente de Millon. Pode consultar-se o quadro das cores e dos valores de  $R_f$  obtidos para um certo número de conservantes através do procedimento CCF em: N. de Kruijff, M. A. H. Rijk, L. A. Pranato-Soetardhi and A. Schouten (1987); *Determination of preservatives in cosmetic products — I. Thin layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products* (J. Chromatography 410, 395-411).
- 7.3. Os valores de  $R_f$  apresentados no quadro seguinte servem de indicação aos valores que podem ser obtidos:

Composto	$hR_f$	Cor
ácido 4-hidroxibenzóico	11	vermelha
metilparabeno	12	vermelha
etilparabeno	17	vermelha
propilparabeno	21	vermelha
butilparabeno	26	vermelha
benzilparabeno	16	vermelha
2-fenoxietanol	29	amarela
1-fenoxi-2-propanol	50	amarela

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

**B. DETERMINAÇÃO****1. Objectivo e campo de aplicação**

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

**2. Definição**

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

**3. Princípio**

A amostra é acidificada com a adição de ácido sulfúrico e, em seguida, colocada em suspensão numa mistura de etanol e água. Depois de aquecer lentamente a mistura para derreter a fase lipídica, por forma a promover a extracção quantitativa, filtrar a mistura.

Os conservantes do filtrado são determinados por HPLC de inversão de fases, usando o 4-hidroxibenzoato de isopropilo como padrão interno.

**4. Reagentes****4.1. Generalidades**

Todos os reagentes devem ser de pureza analítica e adequados para HPLC quando apropriado. Deve utilizar-se água destilada, ou água cuja pureza seja, no mínimo, igual.

**4.2. Etanol, absoluto.****4.3. 2-fenoxietanol.****4.4. 1-fenoxi-2-propanol.**

- 4.5. 4-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno).
- 4.6. 4-hidroxibenzoato de etilo (etilparabeno).
- 4.7. 4-hidroxibenzoato de n-propilo (propilparabeno).
- 4.8. 4-hidroxibenzoato de isopropilo (isopropilparabeno).
- 4.9. 4-hidroxibenzoato de n-butilo (butilparabeno).
- 4.10. 4-hidroxibenzoato de benzilo (benzilparabeno).
- 4.11. Tetrahidrofurano.
- 4.12. Metanol.
- 4.13. Acetonitrilo.
- 4.14. Solução de ácido sulfúrico,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$ .
- 4.15. Mistura de etanol/água  
Misturar 9 volumes de etanol (4.2) e 1 volume de água.
- 4.16. Padrão interno  
Pesar cuidadosamente cerca de 0,25 g de isopropilparabeno (4.8), transferir para um balão graduado de 500 ml, dissolver e completar o volume com a mistura de etanol/água (4.15).
- 4.17. Fase móvel: mistura de tetrahidrofurano/água/metanol/acetonitrilo  
Misturar 5 volumes de tetrahidrofurano, 60 volumes de água, 10 volumes de metanol e 25 volumes de acetonitrilo.
- 4.18. Solução-mãe de conservantes  
Pesar cuidadosamente cerca de 0,2 g de 2-fenoxietanol, 0,2 g de 1-fenoxi-2-propanol, 0,05 g de metilparabeno, 0,05 g de etilparabeno, 0,05 g de propilparabeno, 0,05 g de butilparabeno e 0,025 g de benzilparabeno para um balão graduado de 100 ml, dissolver e completar o volume com a mistura de etanol/água.  
Mantida em frigorífico, a solução permanece estável durante uma semana.
- 4.19. Soluções-padrão de conservantes  
A partir da solução-mãe (4.18), transferir respectivamente 20,00 ml, 10,00 ml, 5,00 ml, 2,00 ml e 1,00 ml para balões graduados de 50 ml. Adicionar a cada balão 10,00 ml do padrão interno (4.16) e 1 ml de solução de ácido sulfúrico (4.14) e completar o volume com a mistura de etanol/água. Estas soluções devem ser preparadas na altura.
5. **Aparelhos e utensílios**  
Material corrente de laboratório e
  - 5.1. Banho de água, capaz de manter uma temperatura de  $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,
  - 5.2. Cromatógrafo líquido de alta resolução com detector UV, comprimento de onda de 280 nm,
  - 5.3. Coluna analítica:  
Aço inoxidável, 25 cm  $\times$  4,6 mm  $\varnothing$  interno (ou 12,5 cm  $\times$  4,6 mm  $\varnothing$  interno) cheia de Nucleosil 5C18, ou equivalente (ver 10.1),
  - 5.4. Tubos de ensaio de 100 ml com tampa de rosca,
  - 5.5. Regularizadores de ebulição, carborundum, dimensão 2-4 mm, ou equivalente.
6. **Técnica**
  - 6.1. Preparação da amostra
    - 6.1.1. Preparação da amostra sem adição de padrão interno  
Pesar aproximadamente 1 g de amostra para um tubo de ensaio de 100 ml com tampa de rosca. Introduzir no tubo, com a ajuda de uma pipeta, 1,0 ml de solução de ácido sulfúrico (4.14) e 50,0 ml de mistura de etanol/água (4.15). Adicionar aproximadamente 1 g de regularizadores de ebulição (5.5), fechar o tubo e agitar vigorosamente até obter uma suspensão homogénea.  
Agitar durante, pelo menos, 1 minuto. Colocar o tubo, durante 5 minutos, num banho de água (5.1) mantido a uma temperatura de  $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  para facilitar a extracção dos conservantes para a fase de etanol.  
Arrefecer imediatamente o tubo debaixo de um jacto de água fria e guardar o extracto no frigorífico durante uma hora. Filtrar o extracto com papel de filtro. Transferir aproximadamente 2 ml do filtrado para um tubo de amostragem de 5 ml. Guardar os extractos no frigorífico e proceder à determinação por HPLC num prazo de 24 horas.

### 6.1.2. Preparação da amostra com adição de padrão interno

Pesar, com uma aproximação de três décimas,  $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  de amostra (a grama) para um tubo de ensaio de 100 ml com tampa de rosca.

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

Agitar durante, pelo menos, 1 minuto. Colocar o tubo, durante 5 minutos, num banho de água mantido a  $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  para facilitar a extracção dos conservantes para a fase de etanol.

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

Transferir aproximadamente 2 ml do filtrado para um tubo de amostragem de 5 ml (solução de ensaio). Guardar o extracto no frigorífico e proceder às determinações por HPLC num prazo de 24 horas.

## 6.2. Cromatografia líquida de alta resolução

### 6.2.1. Condições cromatográficas

- Fase móvel: mistura de tetrahydrofurano/água/metanol/acetonitrilo (4.17),
- Débito: 1,5 ml/minuto,
- Comprimento de onda de revelação: 280 nm.

### 6.2.2. Calibração

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

### 6.2.3. Determinação

Injectar 10  $\mu\text{l}$  da solução da amostra sem padrão interno (6.1.1) no cromatógrafo e registar o cromatograma.

Injectar 10  $\mu\text{l}$  de uma das soluções-padrão dos conservantes (4.19) e registar o cromatograma. Comparar os cromatogramas obtidos. Se, no cromatograma do extracto da amostra (6.1.1), não houver qualquer pico que tenha aproximadamente o mesmo tempo de retenção que o isopropilparabeno (padrão interno recomendado), injectar 10  $\mu\text{l}$  de solução de amostra com padrão interno (6.1.2). Registar o cromatograma e medir as alturas dos picos.

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

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

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

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

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

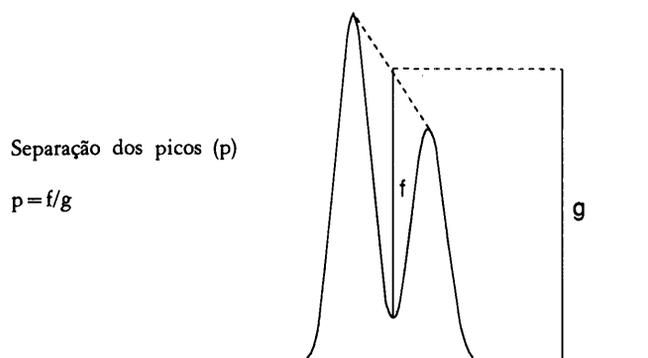


Figura 1: Separação dos picos

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

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

Factor de assimetria ( $A_s$ )

$A_s = b/a$

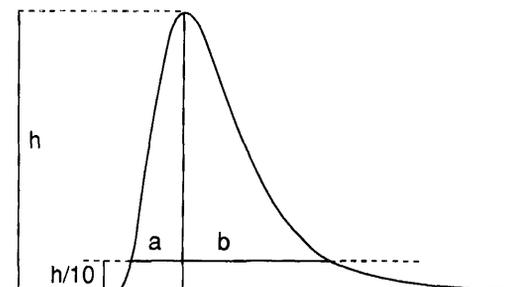


Figura 2: Factor de assimetria dos picos

- Obter-se-á uma linha de base estável.

## 7. Cálculos

Utilizar uma curva de calibração (6.2.2) e as relações entre as alturas dos picos dos conservantes analisados e a altura dos picos do padrão interno para calcular a concentração dos conservantes na solução da amostra. Calcular os teores de 2-fenoxietanol, 1-fenoxi-2-propanol, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4-hidroxibenzoato de etilo, 4-hidroxibenzoato de propilo, 4-hidroxibenzoato de butilo e 4-hidroxibenzoato de benzilo,  $w_i$ , como percentagem em peso (% m/m), usando a fórmula:

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

em que:

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

$a$  = a massa (g) da toma.

## 8. Repetibilidade (1)

Vejam-se as observações do ponto 10.5.

## 9. Reprodutibilidade (1)

Vejam-se as observações do ponto 10.5.

## 10. Observações

### 10.1. Fase estacionária

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

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

### 10.2. Comprimento de onda de detecção

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

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

(1) ISO 5725.

## 10.3. Interferências

Nas condições descritas neste método, podem também ser eluídos muitos outros compostos, como conservantes e aditivos cosméticos. Os tempos de retenção de um grande número de conservantes mencionados no anexo VI da Directiva do Conselho relativa a produtos cosméticos constam da lista incluída em: N. de Kruijf, A. Schouten, M. A. H. Rijk and L. A. Pranato-Soetardhi (1989): *Determination of preservatives in cosmetic products — II. High performance liquid chromatographic identification* (J. Chromatography 469, 317-398).

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

10.5. O método foi investigado num ensaio de colaboração em que participaram nove laboratórios. Foram analisadas três amostras. O quadro abaixo apresenta, para cada uma das três amostras, uma lista das médias em % m/m (m), as repetibilidades (r) e as reprodutibilidades (R) das substâncias a analisar que continham:

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