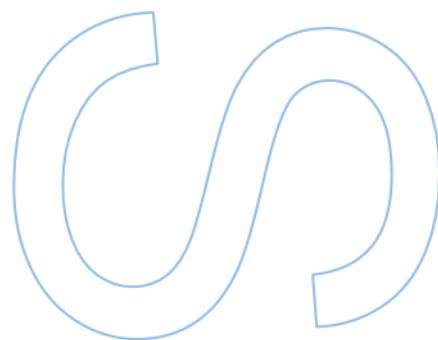
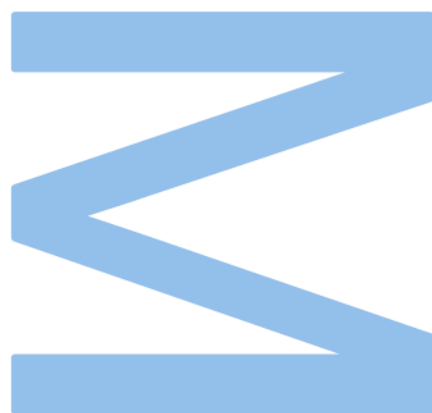


Validação de um método para o doseamento de conservantes em produtos cosméticos, por UPLC-PDA

Raquel da Silva Capítulo

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química
Departamento Química e Bioquímica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2025



Validação de um método para o doseamento de conservantes em produtos cosméticos, por UPLC-PDA

Raquel da Silva Capítulo

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado em
Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química
Departamento Química e Bioquímica
2025

Orientador

Paulo Joaquim Ferreira de Almeida, Professor Auxiliar, Faculdade
de Ciências da Universidade do Porto

Supervisor externo na Entidade de Acolhimento

Paula Maria Ramos Martinho Figueiredo, Diretora da Unidade
Laboratorial de Química e Tecnologia Farmacêuticas da Direção
de Comprovação da Qualidade, INFARMED, I.P.

Porque é quando estamos no fundo que nos apercebemos da força e da coragem que realmente temos, que nos eleva e nos permite viver de uma maneira que nunca imaginávamos. A mim, mesmo com uma ileostomia, nunca desisti.

“what doesn’t kill you, makes you stronger”

Agradecimentos

A conclusão do estágio e a elaboração do presente relatório representam algo que nunca pensei vir a alcançar. É, sem dúvida, uma etapa bastante significativa para mim, não só a nível académico, mas também pessoal. Esta conquista não teria sido possível sem o apoio, o incentivo e a presença de inúmeras pessoas que marcaram a diferença no meu percurso e a quem estarei eternamente grata.

Ao instituto INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., pela oportunidade e privilégio de integrar no ambiente profissional tão enriquecedor. À Diretora Maria João, pela criação de um estágio que me permitiu experienciar e aprofundar conhecimentos. À Diretora Paula Martinho, pela disponibilidade e compreensão demonstradas. À Assunção e Cláudia pelo acompanhamento do estágio na área dos cosméticos. Às minhas queridas colegas de gabinete, Dulce, Margarida e Sara, por toda a ajuda e carinho que sempre demonstraram – sem vocês não teria sido o mesmo. A todos os colegas e funcionários, pelos conhecimentos partilhados e pela boa disposição transmitida diariamente.

Ao meu orientador, Paulo Almeida, pelo apoio, motivação e ajuda ao longo de todas as fases deste trabalho, que foram fulcrais para a sua redação e evolução. E também por ter sido um adversário à altura nos torneios de voleibol, que me deixaram muitas saudades.

A todos os professores que fizeram parte do meu percurso académico, que contribuíram para a minha formação e me permitiram chegar ao nível de ensino que hoje alcancei. Obrigada pela paciência, pelo conhecimento e pelo apoio transmitido.

Às minhas colegas do Porto, do mestrado, do basquetebol e do voleibol, pelos momentos partilhados de stress e dúvida; de companheirismo e entusiasmo; e de muitas risadas. Obrigada por me terem acolhido e por marcarem a minha vida para sempre.

A todos os meus amigos que me apoiaram incondicionalmente em todas as fases, boas e más, da minha vida – amigas do voleibol, da escola, da faculdade e de momentos espontâneos da vida – obrigada por me terem permitido crescer, experienciar e aproveitar a vida ao vosso lado. Ao Pedro pelo apoio tremendo nas fases mais críticas, pelo carinho constante, por ser o meu dia a dia e o meu parceiro de vida – um obrigada não chega.

Aos meus médicos, em especial à Dr.^a Joana Torres e à Dr.^a Mariana Sousa, bem como a todos os enfermeiros e auxiliares de saúde que me possibilitaram de estar onde estou hoje e nas condições em que me encontro. Obrigada pelo sorriso e pela palavra amiga nos momentos mais desafiantes. Para sempre grata.

Por fim, mas não menos importante, à minha família, um agradecimento que não cabe no peito, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, dos mais desafiantes aos mais felizes. Especialmente à minha mãe e aos meus avós, pelas palavras sábias, pelo amor e conforto nos momentos certos, pelo ombro amigo ao longo destes anos, pelos conselhos transmitidos e, sobretudo, por acreditarem em mim mesmo quando eu própria duvidava. Obrigada por me incentivarem e por me mostrarem que, se acreditarmos verdadeiramente, tudo é possível. Sem dúvida, são o meu maior pilar. Esta conquista é vossa.

A todos, um sincero obrigada do fundo do meu coração.

Resumo

O setor dos produtos cosméticos assume crescente relevância, exigindo regulamentação rigorosa e métodos analíticos fiáveis de modo a assegurar a segurança e qualidade destes produtos para o consumidor final. O presente relatório teve como principal objetivo a validação de um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detetor de arranjo de fotodíodos (UPLC-PDA) para a determinação de conservantes em produtos cosméticos, confirmando a adequação do método às exigências regulamentares através da avaliação de parâmetros essenciais de desempenho (linearidade, exatidão, repetibilidade, limites de deteção e de quantificação). Posteriormente, o método aplicou-se à análise de cinquenta amostras de aftershaves comercializadas em Portugal, abrangendo vinte e uma marcas distintas. Verificou-se, na maioria dos casos, conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1223/2009, embora tenham sido identificadas não conformidades na rotulagem em algumas amostras. O estudo evidencia a importância do INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. – no controlo laboratorial de cosméticos, reforçando o papel da validação analítica na monitorização de conservantes e garantindo o controlo da qualidade, a proteção da saúde pública e a confiança do consumidor.

Palavras-chave: cosméticos, conservantes, UPLC-PDA, validação de método, controlo da qualidade

Abstract

The cosmetics industry is becoming increasingly important, requiring strict regulation and reliable analytical methods to ensure the safety and quality of these products for the end consumer. The main goal of this report was to validate a method using ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detector (UPLC-PDA) for the determination of preservatives in cosmetic products, confirming the suitability of the method to regulatory requirements by evaluating essential performance parameters (linearity, accuracy, repeatability, detection and quantification limits). Subsequently, the method was applied to the analysis of fifty aftershave samples marketed in Portugal, covering twenty-one different brands. In most cases, compliance with Regulation (EC) No. 1223/2009 was verified, although labeling inconsistencies were identified in some samples. The study highlights the importance of INFARMED – National Authority for Medicines and Health Products, I.P. – in the laboratory control of cosmetics, reinforcing the role of analytical validation in monitoring preservatives and ensuring quality control, public health protection, and consumer confidence.

Keywords: cosmetics, preservatives, UPLC-PDA, method validation, quality control

Índice

Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Entidade de acolhimento.....	1
1.2. Cosmética.....	4
1.2.1. Principais tipos de produtos cosméticos e a sua classificação	4
1.2.2. Segurança e riscos.....	5
1.3. Conservantes	6
1.3.1. Função e importância dos conservantes	6
1.3.2. Toxicidade e riscos para a saúde	7
1.3.3. Classificação dos conservantes	8
1.3.4. Doseamento e métodos analíticos.....	8
1.3.5. Regulamentação em cosméticos	8
1.3.6. Conservantes estudados.....	10
1.3.6.1. Fenoxietanol	11
1.3.6.2. Ácido benzóico	11
1.3.6.3. Ácido Sórbico.....	12
1.3.6.4. Clorhexidina.....	12
1.3.6.5. Clorfenesina.....	12
1.3.6.6. Parabenos	13
1.3.6.6.1. Metilparabeno	14
1.3.6.6.2. Etilparabeno.....	15
1.3.6.6.3. Propilparabeno e Butilparabeno.....	15
1.3.6.6.4. Isopropilparabeno e Isobutilparabeno.....	16
1.4. Cromatografia Líquida	17
1.4.1. HPLC vs. UPLC	18

1.4.2.	Detetores em cromatografia líquida	20
1.4.3.	UPLC-PDA.....	21
1.5.	Validação do método	22
1.5.1.	Linearidade	23
1.5.2.	Repetibilidade	24
1.5.3.	Exatidão	24
1.5.4.	Limite de Detecção e Quantificação (LOD e LOQ)	25
1.6.	Objetivos do Projeto	26
2.	Parte Experimental.....	27
2.1.	Metodologia.....	27
2.1.1.	Equipamentos e Materiais.....	27
2.1.2.	Reagentes e Padrões.....	28
2.1.3.	Condições Cromatográficas	28
2.1.4.	Preparação de soluções.....	30
2.1.4.1.	Fase Móvel A.....	30
2.1.4.2.	Fase Móvel B.....	30
2.1.4.3.	Soluções de Limpeza	31
2.1.4.4.	Solução Extração	31
2.1.4.5.	Soluções <i>stock</i> de referência	31
2.1.4.6.	Soluções Padrão	32
2.1.4.7.	Padrões de Controlo.....	34
2.1.5.	Preparação de Amostras.....	34
3.	Resultados e Discussão.....	36
3.1.	Validação do método	36
3.1.1.	Identificação dos picos cromatográficos	36
3.1.1.1.	Identificação dos picos a 214nm.....	37
3.1.1.2.	Identificação dos picos a 254nm.....	39
3.1.1.3.	Identificação dos picos na solução mistura P7	42

3.1.2.	Linearidade	44
3.1.3.	Branco	48
3.1.4.	Repetibilidade	52
3.1.5.	Exatidão	56
3.1.6.	Limite de Detecção e Quantificação (LOD e LOQ)	58
3.1.7.	Efeito de Matriz	60
3.2.	Amostras	60
3.2.1.	<i>Screening</i>	61
3.2.1.1.	Amostra A	62
3.2.1.2.	Amostra B	62
3.2.1.3.	Amostra C	64
3.2.1.4.	Amostra D	65
3.2.1.5.	Amostra E	67
3.2.2.	Doseamento	69
3.3.	Apreciação global	73
4.	Conclusão	79
5.	Referências Bibliográficas	81
6.	Anexos	87
6.1.	Anexo I	87

Lista de Tabelas

Tabela 1. Programa de gradiente utilizado na separação dos conservantes por UPLC: composição das fases móveis ao longo do tempo.	30
Tabela 2. Massas pesadas e respetivos balões volumétricos necessários para a preparação das soluções stock dos conservantes.	32
Tabela 3. Preparação das soluções padrão para os conservantes, exceto clorhexidina e butilparabeno.	33
Tabela 4. Preparação das soluções padrão para a clorhexidina.	33
Tabela 5. Preparação das soluções padrão para o butilparabeno.	33
Tabela 6. T_R dos conservantes na mistura P7, em comparação com as injeções individuais, em ambos os comprimentos de onda (214 e 254 nm).	44
Tabela 7. Resumo das retas de calibração e dos respetivos R^2 obtidos para cada conservante, nos comprimentos de onda indicados.	48
Tabela 8. Valores de RSD% das áreas e dos t_R para os conservantes nos padrões de controlo P4 e P7, obtidos a 214 nm e 254 nm.	56
Tabela 9. Valores de Recuperação (%) dos conservantes nos padrões de controlo P4 e P7, obtidos a 214 nm e 254 nm.	57
Tabela 10. Valores do ruído de linha de base do branco anterior, média dos valores da altura do pico, média do valor da razão S/N utilizado no ponto LOQ e RSD% da área ($n=6$) para cada conservante no P1.	59
Tabela 11. Conservantes declarados nos rótulos das amostras A – E.	61
Tabela 12. Resultados do screening para as amostra A-E, considerando os critérios de T_R , pureza do pico e correspondência espectral.	69
Tabela 13. Conservantes doseados nas amostras B–E e respetivos resultados em percentagem (m/m).	72
Tabela 14. Limites máximos permitidos para os conservantes em estudo, conforme estabelecido no Anexo V do Regulamento (CE) n.º 1223/2009.	76
Tabela 15. Concentração dos conservantes efetivamente doseados nas amostras B–E, em comparação com os limites legais definidos no Anexo V do Regulamento (CE) n.º 1223/2009, e indicação da conformidade.	77

Lista de Figuras

Figura 1. Instalações do INFARMED, I.P., em Lisboa, correspondentes ao pavilhão onde se localizam várias unidades Laboratoriais, incluindo a Unidade Laboratorial de Química e Tecnologia Farmacêuticas, onde decorreu o estágio.	2
Figura 2. Organograma do INFARMED.	3
Figura 3. Fórmula química estrutural dos conservantes doseados (adaptado de Merck KGaA, n.d., Sigma-Aldrich) [33].	16
Figura 4. Distribuição de diferentes classes de compostos ao longo de um gradiente de polaridade, desde moléculas altamente polares até moléculas apolares.	17
Figura 5. Esquema simplificado de um sistema de cromatografia líquida (UPLC), composto por reservatório da fase móvel, bomba, injetor, coluna, detetor e estação de dados. No presente trabalho, recorreu-se a um sistema UPLC-PDA.	19
Figura 6. Fotografia da balança analítica utilizada ao longo do estágio.	28
Figura 7. Fotografias do equipamento de UPLC-PDA, bem como a coluna e pré-coluna utilizada, respetivamente.	29
Figura 8. Pico cromatográfico de identificação do Fenoxietanol, obtido a 214 nm, com um t_R de 1,715 minutos.	38
Figura 9. Pico cromatográfico de identificação do Ácido Benzoico, obtido a 214 nm, com um t_R de 2,562 minutos.	38
Figura 10. Pico cromatográfico de identificação do Clorfenesina, obtido a 214 nm, com um t_R de 4,091 minutos.	38
Figura 11. Pico cromatográfico de identificação do Clorhexidina, obtido a 214 nm, com um t_R de 7,392 minutos.	39
Figura 12. Pico cromatográfico de identificação do Ácido Sórico, obtido a 254 nm, com um t_R de 2,369 minutos.	39
Figura 13. Pico cromatográfico de identificação do Metilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 3,292 minutos.	40
Figura 14. Pico cromatográfico de identificação do Etilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 5,261 minutos.	40
Figura 15. Pico cromatográfico de identificação do Isopropilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 6,795 minutos.	40
Figura 16. Pico cromatográfico de identificação do Propilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 7,126 minutos.	41
Figura 17. Pico cromatográfico de identificação do Isobutilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 8,519 minutos.	41

Figura 18. Pico cromatográfico de identificação do Butilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 8,675 minutos.	41
Figura 19. Cromatograma de identificação da solução mistura P7, contendo todos os conservantes, com exceção da clorhexidina, obtido a 214 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.	42
Figura 20. Cromatograma de identificação da solução mistura P7, contendo todos os conservantes, com exceção da clorhexidina, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.	43
Figura 21. Curva de calibração do Fenoxietanol, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	45
Figura 22. Curva de calibração do Ácido Benzóico, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	45
Figura 23. Curva de calibração da Clorhexidina, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	46
Figura 24. Curva de calibração da Clorfenesina, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	46
Figura 25. Curva de calibração do Ácido Sórbico, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	46
Figura 26. Curva de calibração do Metilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	46
Figura 27. Curva de calibração do Etilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	47
Figura 28. Curva de calibração do Propilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	47
Figura 29. Curva de calibração do Butilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	47
Figura 30. Curva de calibração do Isopropilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	47
Figura 31. Curva de calibração do Isobutilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.	48
Figura 32. Cromatograma do branco obtido a 214 nm para o conjunto de conservantes.	49

Figura 33. Cromatograma do branco obtido a 214 nm, evidenciando contaminação no analito –butilparabeno.	50
Figura 34. Cromatograma do branco obtido a 254 nm.	50
Figura 35. Cromatograma do branco obtido a 214 nm para a clorhexidina.	51
Figura 36. Cromatograma do branco obtido a 254 nm para o butilparabeno.	51
Figura 37. Cromatograma do padrão P4, obtido a 214 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.	53
Figura 38. Cromatograma do padrão P7, obtido a 214 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.	53
Figura 39. Cromatograma do padrão P4 para a Clorhexidina, obtido a 214 nm.	53
Figura 40. Cromatograma do padrão P7 para a Clorhexidina, obtido a 214 nm.	54
Figura 41. Cromatograma do padrão P4, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.	54
Figura 42. Cromatograma do padrão P7, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.	54
Figura 43. Cromatograma do padrão P4 para o Butilparabeno, obtido a 254 nm.	55
Figura 44. Cromatograma do padrão P7 para o Butilparabeno, obtido a 254 nm.	55
Figura 45. Cromatograma do padrão ao nível de concentração do LOQ – P1, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 2 - ácido sórbico, 4 - metilparabeno, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.	59
Figura 46. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra B), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra (vermelho).	63
Figura 47. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Fenoxietanol (amostra C), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.	64

Figura 48. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra C), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra(vermelho).	65
Figura 49. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Benzóico (amostra D), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.	66
Figura 50. Sobreposição do espectro PDA obtido para a Clorfenesina (amostra D), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.	66
Figura 51. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra D), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra (vermelho).	67
Figura 52. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Fenoxietanol (amostra E), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.	68
Figura 53. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Benzóico (amostra E), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral de um conservante não declarado na rotulagem.	68
Figura 54. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Clorfenesina (amostra E), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.	68
Figura 55. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra E), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral de um conservante não declarado na rotulagem. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra (vermelho).	69
Figura 56. Distribuição das amostras por número de conservantes declarados, onde: 0 conservantes corresponde a 22%; 1 conservante corresponde a 62%; 2 conservantes corresponde a 10% e ≥ 3 conservantes corresponde a 6,0%.	73
Figura 57. Percentagem de amostras conformes e não conformes relativamente à rotulagem, onde 86% (43 amostras) se encontram conformes e 14% (7 amostras) não conformes.	74
Figura 58. Não conformidades detetadas relativamente ao rótulo (1 amostra com mais conservantes do que rotulado; 3 amostras com menos 1 conservante; 1 amostra com	

menos 2 conservantes e 2 amostras sem qualquer conservante apesar de declarado).
..... 75

- Figura A.1.** Espectro PDA do Pico 4 (amostra A) obtido a 214 nm. O pico revelou-se homogéneo, contudo não apresentou correspondência com a biblioteca..... 87
- Figura A.2.** Espectro PDA da Clorfenesina (amostra A) obtido a 214 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca..... 87
- Figura A.3.** Espectro PDA da Clorhexidina (amostra A) obtido a 214 nm, sem correspondência com a biblioteca..... 87
- Figura A.4.** Espectro PDA do Ácido Sórbico (amostra A) obtido a 254 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca..... 88
- Figura A.5.** Espectro PDA do Butilparabeno (amostra A) obtido a 254 nm, sem correspondência com a biblioteca..... 88
- Figura A.6.** Espectro PDA do Fenoxietanol (amostra B) obtido a 214 nm. O pico revelou-se homogéneo, contudo não apresentou correspondência com a biblioteca..... 88
- Figura A.7.** Espectro PDA do Pico 4 (amostra B) obtido a 214 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca..... 89
- Figura A.8.** Espectro PDA do Ácido Benzoico (amostra B) obtido a 214 nm, sem homogeneidade do pico nem correspondência com a biblioteca. 89
- Figura A.9.** Fortificação da Amostra B: sobreposição do cromatograma PDA da amostra B (verde), obtido a 254 nm, com o cromatograma PDA do padrão de controlo P7 (preto) e com o cromatograma PDA da amostra B fortificada (azul), concluindo-se que a amostra tem ácido sórbico, mas não ácido benzoico. O pequeno pico a azul no t_R do ácido benzoico apenas se deve ao padrão de controlo contido na solução amostra fortificada. 89
- Figura A.10.** Espectro PDA do Ácido Benzoico (amostra C) obtido a 214 nm. O pico revelou-se homogéneo, contudo não apresentou correspondência com a biblioteca. 90
- Figura A.11.** Fortificação da Amostra C: sobreposição do cromatograma PDA da amostra C (verde), obtido a 254 nm, com o cromatograma PDA do padrão de controlo P7 (preto) e com o cromatograma PDA da amostra C fortificada (azul), concluindo-se que a solução amostra tem ácido sórbico e fenoxietanol, mas não ácido benzoico. O pequeno pico a azul no t_R do ácido benzoico apenas se deve ao padrão de controlo contido na amostra fortificada. 90
- Figura A.12.** Espectro PDA do Fenoxietanol (amostra D) obtido a 214 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca..... 90

Figura A.13. *Fortificação da Amostra D: sobreposição do cromatograma PDA da amostra D (verde), obtido a 254 nm, com o cromatograma PDA do padrão de controlo P7 (preto) e com o cromatograma PDA da amostra C fortificada (azul), concluindo-se que a solução amostra tem ácido benzóico, clorfenesina e ácido sórbico. 91*

Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AU	Unidade arbitrária
CE	Comissão Europeia
CMR	Carcinogénicos, mutagénicos ou tóxicos para a reprodução
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detetor de Arranjo de Díodos)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECHA	Agência Europeia Dos Produtos Químicos
ELSD	Espalhamento de luz evaporativo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
IR	Infravermelho
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MRC	Materiais de Referência Certificados
MS	Deteção por espectrometria de massa – modo simples
MS/MS	Deteção por espectrometria de massa – modo tandem
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCP	<i>Personal Care Products</i>
PDA	<i>Photodiode Array Detector</i> (Detetor de Arranjo de Fotodíodos)
PTFE	Filtros de politetrafluoretileno
RNA	Ácido Ribonucleico
RSD	Desvio padrão relativo
SCCS	Comité Científico para a Segurança dos Consumidores
S/N	Razão Sinal/Ruído
TOC	<i>Total Organic Carbon</i>
t_R	Tempo de Retenção
UE	União Europeia
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UPLC-PDA Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Detetor
de Arranjo de Fotodíodos

UV Ultravioleta

1. Introdução

O setor dos produtos cosméticos tem assumido uma importância crescente no contexto atual, não só pela diversidade e volume de produtos disponibilizados no mercado, mas também pela relevância atribuída à segurança e qualidade destes produtos para o consumidor final. Neste enquadramento, a regulamentação e o controlo rigoroso dos ingredientes utilizados são essenciais para garantir que os cosméticos cumpram os requisitos legais e assegurem a saúde pública.

Durante o estágio realizado no INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. –, entidade responsável pela regulação, inspeção e controlo laboratorial dos produtos cosméticos em Portugal, aprofundaram-se conhecimentos sobre os métodos analíticos aplicados à deteção e doseamento de conservantes, substâncias cruciais na preservação da integridade microbiológica dos produtos. O presente relatório incide, assim, sobre a validação de um método para o doseamento de conservantes por UPLC-PDA, contribuindo para a garantia da qualidade e segurança dos produtos cosméticos.

A validação de métodos analíticos constitui um requisito fundamental para assegurar a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos no controlo da qualidade de cosméticos. Inicialmente, procedeu-se à validação de um método para a determinação de conservantes em desodorizantes; contudo, devido ao atraso na disponibilização das amostras, não se aplicou essa validação em amostras reais. Assim, recorreu-se ao método previamente validado pelo INFARMED para a determinação de conservantes em amostras de *aftershave*s, cuja execução e acompanhamento decorreram durante o estágio.

1.1. Entidade de acolhimento

O INFARMED é um instituto público de regime especial, inserido na administração indireta do Estado, com autonomia administrativa, financeira e património próprio, sob direção e tutela do Ministério da Saúde [1].

Com sede em Lisboa, o INFARMED é um organismo central com competência em todo o território nacional, mantendo a colaboração com os órgãos regionais das Regiões Autónomas, em conformidade com as respetivas atribuições. Desempenha um papel

central na garantia da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos de uso humano, dispositivos médicos, produtos cosméticos e de higiene corporal no mercado português. Na Figura 1 encontra-se ilustrado o pavilhão onde decorreu o estágio, localizado nas instalações do INFARMED, em Lisboa [1]:



Figura 1. Instalações do INFARMED, I.P., em Lisboa, correspondentes ao pavilhão onde se localizam várias unidades Laboratoriais, incluindo a Unidade Laboratorial de Química e Tecnologia Farmacêuticas, onde decorreu o estágio.

Criado em 1993, o INFARMED tem por missão a regulação e supervisão dos setores dos medicamentos de uso humano e produtos de saúde, garantindo aos profissionais de saúde e aos cidadãos o seu acesso, qualidade, eficácia e segurança, promovendo simultaneamente a saúde pública e o uso racional dos produtos de saúde. A visão da entidade consiste em alcançar o reconhecimento como uma das melhores autoridades reguladoras na União Europeia, promovendo a inovação e o desempenho na regulação de medicamentos e tecnologias de saúde [1].

Desta forma, a sua ação baseia-se em valores fundamentais, nomeadamente [1]:

- Competência, através de conhecimentos técnicos e científicos especializados;
- Integridade, atuando com transparência, responsabilidade, respeito e imparcialidade;
- Inovação, procura melhorar e simplificar processos;
- Excelência, através do cumprimento de elevados padrões de desempenho;

- Compromisso, centrado no interesse público e nos cidadãos.

O INFARMED desenvolve inúmeras atividades principais, como a avaliação e autorização de medicamentos de uso humano, bem como a avaliação e controlo da qualidade de medicamentos, cosméticos e dispositivos médicos. A fiscalização de entidades do setor farmacêutico, juntamente com as inspeções técnicas e laboratoriais integra igualmente as suas competências. Destacam-se ainda: a monitorização da segurança dos produtos de saúde (farmacovigilância e cosmetovigilância); a participação em redes e agências reguladoras europeias; e a promoção do uso racional dos medicamentos [1].

Em 2025, a organização Interna do INFARMED sofreu alterações nas suas designações, incluindo, entre outras: o Conselho Diretivo; Direção de Avaliação de Medicamentos; Direção de Gestão do Risco de Medicamentos; Direção de Produtos de Saúde; Direção de Inspeção e Licenciamentos; Direção de Comprovação da Qualidade; Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde e Direção de Informação e Planeamento Estratégico. Na Figura 2 apresenta-se o organograma atualizado do INFARMED, I.P., com destaque para a estrutura das unidades laboratoriais [1]:

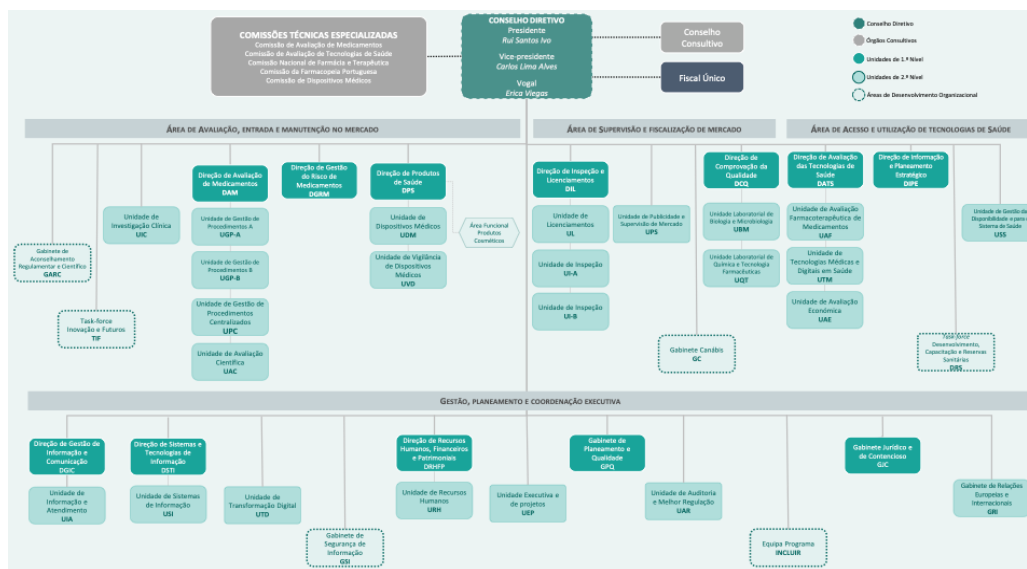


Figura 2. Organograma do INFARMED.

Como observado na Figura 2, a Direção de Comprovação da Qualidade é composta pela Unidade Laboratorial de Biologia e Microbiologia e pela Unidade Laboratorial de Química e Tecnologia Farmacêuticas, sendo esta última a unidade responsável pela

realização do estágio, mais concretamente no Departamento de Produtos de Cosmética e de Higiene Corporal [1].

Relativamente aos produtos cosméticos e de higiene corporal, o INFARMED assume responsabilidades enquanto autoridade competente nacional, conforme o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho. As suas funções incluem, além da monitorização do mercado e avaliação e análise de ingredientes e formulações, a realização de ensaios laboratoriais destinados a verificar a conformidade com os requisitos legais. Estas atividades são essenciais para garantir a segurança do consumidor e o cumprimento das normas em vigor [1, 2].

Enquanto entidade reguladora, o INFARMED, não só fiscaliza e supervisiona o mercado, como também contribui para a credibilização do setor da saúde junto dos cidadãos. A sua ação rigorosa e transparente é fundamental para prevenir riscos para a saúde pública, assegurar o cumprimento da legislação nacional e europeia, apoiar a inovação e o desenvolvimento de novos produtos com segurança comprovada e manter a confiança dos cidadãos nos produtos de saúde disponíveis no mercado [1].

1.2. Cosmética

Nos últimos anos, os produtos de cosmética têm registado um crescimento exponencial, desempenhando um papel fulcral na melhoria da aparência, higiene e hidratação, com impacto direto no bem-estar e na qualidade de vida das populações [3, 4]. Estes produtos integram atualmente os hábitos quotidianos da sociedade, na medida em que são utilizados por pessoas de diferentes idades e contextos sociais [5].

A utilização de produtos cosméticos visa o aperfeiçoamento estético do rosto, corpo e cabelo, tendo como fim o combate à hidratação, antienvelhecimento, branqueamento e limpeza. Esta prática reflete uma crescente preocupação com a higiene, bem-estar e aparência, exigindo, por isso, elevados padrões de qualidade e segurança [6, 7].

1.2.1. Principais tipos de produtos cosméticos e a sua classificação

O rosto e o corpo são os principais destinatários da aplicação dos cosméticos, com o intuito de limpar, prevenir os sinais de envelhecimento, embelezar e melhorar a aparência, permitindo realçar as características estéticas [4, 5]. Esse conceito é antigo e está intimamente relacionado com o conceito de beleza e de autocuidado. Podem

incluir uma grande diversidade de produtos, como: pasta de dentes, champô, amaciador, *aftershaves*, gel e creme para pentear, *skincare*, perfumes, batons, vernizes, cores de cabelo, sprays para cabelos, desodorizantes e maquiagem, sendo esta última considerada um subconjunto dos cosméticos, responsável pela parte do cuidado/aperfeiçoamento estético do rosto [5]. Existem inúmeros produtos de cosmética, desde produtos capilares: de maquiagem, de *skincare*, de cuidados com a pele, perfumes, vernizes, a produtos para a cavidade oral: pasta de dentes, elixires, branqueamentos [3,5,8]

Tanto os cosméticos, como os produtos de higiene pessoal (*Personal Care Products* – PCP) são amplamente utilizados em todo o mundo, apresentando funções relacionadas com o cuidado, a limpeza e a beleza do rosto, pele e cabelo [3]. Apesar de a cosmética abranger uma vasta gama de produtos, não se consideram cosméticos os que se destinam a ser ingeridos, inalados, injetados ou implantados no corpo humano [1].

Designam-se produtos de fronteira aqueles cuja classificação suscita dúvidas, devido à sua composição, local de aplicação, apresentação e modo de ação. Deste modo, a sua avaliação deve ser realizada individualmente, considerando todas as características específicas de cada produto [1].

1.2.2. Segurança e riscos

Os componentes químicos desses produtos podem ser absorvidos pela pele, conseguindo penetrar a barreira cutânea (derme) e, conseqüentemente, alcançar a circulação sistémica. Caso tal aconteça, podem desencadear efeitos graves significativos, nomeadamente: alterações endócrinas, cancerosas, neurológicas, reprodutivas (gravidez, fertilidade), estando associadas a reações alérgicas e irritação da pele. Deste modo, os produtos com aplicação dérmica não são considerados produtos em que seja necessário o seu enxaguamento ou breve utilização, mas sim classificados consoante o tempo de utilização: uso prolongado (hidratantes, maquiagem, tratamento labial), sazonal (protetores solares) e ocasional (tintas de cabelo, vernizes) [3].

A reações alérgicas relacionadas com desodorizantes, antitranspirantes e fragrâncias devem-se principalmente pela própria fragrância ou por outros componentes presentes na formulação. Estas substâncias podem ser absorvidas pelo organismo

através da pele, dos pulmões, das vias respiratórias, pela ingestão ou por via nasal, alcançando diretamente o cérebro e podem provocar sintomas: dores de cabeça, tonturas, fadiga, irritação ocular, nasal e da garganta, bem como lapsos na memória. Adicionalmente, as fragrâncias presentes no ar podem induzir dermatite de contacto aérea – um tipo de irritação cutânea [5].

Alguns produtos podem conter compostos sintéticos nocivos para a pele, incluindo, em certos casos, a presença de metais pesados, como o chumbo. Por outro lado, existem compostos naturais, sustentáveis, economicamente acessíveis e geralmente menos agressivos para o utilizador, especialmente: a manteiga de *karité*, o extrato de rosa e o açúcar de cana [5].

1.3. Conservantes

Os conservantes constituem uma das classes de ingredientes mais relevantes em produtos cosméticos e de higiene pessoal, desempenhando um papel fundamental na estabilidade e segurança das formulações. A sua utilização visa prevenir o crescimento microbiano e prolongar a vida útil do produto, garantindo a proteção do consumidor.

Contudo, a presença destas substâncias levanta preocupações quanto a potenciais efeitos adversos na saúde e no ambiente, o que justifica a sua regulamentação rigorosa a nível europeu.

Neste capítulo, é abordado a função dos conservantes, os riscos associados, a sua classificação, os métodos de doseamento e os principais aspetos regulamentares que enquadram a sua utilização.

1.3.1. Função e importância dos conservantes

O uso generalizado de cosméticos e PCP por pessoas de todas as idades tem gerado uma crescente preocupação quanto à sua segurança. Estes podem ser disponibilizados sob a forma de soluções, emulsões, géis ou cremes [9]. Neste contexto, alguns estudos de revisão utilizam critérios específicos para identificar ingredientes potencialmente preocupantes, nomeadamente a frequência de utilização, a evidência científica de toxicidade e o grau de exposição dérmica [3].

Muitos destes produtos contêm conservantes, cuja principal função consiste em inibir o desenvolvimento de microrganismos, sendo amplamente utilizados em produtos farmacêuticos e alimentares [6].

Os cosméticos com elevado teor de água podem proporcionar um ambiente propício ao crescimento de bactérias, fungos e outros microrganismos. Por este motivo, os conservantes são fundamentais para prevenir a alteração e degradação da formulação, prolongar a vida útil dos produtos e proteger os consumidores [9]. A sua adição de conservante permite assegurar a estabilidade e segurança dos produtos durante o seu prazo de validade, especialmente: cremes hidratantes, *sérums* ou produtos de maquilhagem, prevenindo infeções ou reações adversas, resultantes da contaminação microbiana dos produtos [7]. Na sua ausência, os cosméticos teriam um tempo de utilização reduzido e poderiam tornar-se veículos de propagação de microrganismos potencialmente nocivos [7].

1.3.2. Toxicidade e riscos para a saúde

Apesar da sua função protetora, certos conservantes podem apresentar toxicidade e originar efeitos adversos graves [3]. Inúmeras substâncias químicas, utilizadas em produtos cosméticos — incluindo conservantes, filtros ultravioleta (UV), aditivos de cor — têm sido associadas ao desenvolvimento de cancro, mutações, toxicidade no desenvolvimento e na reprodução, assim como a perturbações endócrinas e da fertilidade. Embora todos os ingredientes cumpram normas regulamentares rigorosas, alguns apenas são permitidos em concentrações reduzidas, devido ao seu potencial tóxico em níveis mais elevados. Para além de provocarem efeitos adversos, certos ingredientes nocivos podem ainda acumular-se no organismo [3].

Diversos ingredientes, como parabenos, acrilatos, octinoxato, hidroxitolueno butilado e metilisotiazolinona, têm merecido especial atenção devido à sua potencial toxicidade [3]. A aplicação generalizada de conservantes pode também desencadear dermatite alérgica de contacto nos consumidores, reforçando a necessidade de um controlo rigoroso da qualidade e segurança dos cosméticos [10].

Os conservantes mais utilizados incluem os seguintes compostos: Álcool benzílico, benzoato de sódio e parabenos, em particular metilparabeno [11].

1.3.3. Classificação dos conservantes

Os conservantes presentes em cosméticos podem ser classificados consoante a sua origem e função. Os conservantes sintéticos – parabenos e agentes libertadores de formaldeído – são os mais tradicionais e são utilizados pela sua eficácia comprovada no controlo do crescimento microbiano [2, 12]. Por outro lado, os conservantes multifuncionais combinam propriedades conservantes com outros benefícios, como a hidratação ou atividade antioxidante, permitindo otimizar a formulação [13, 14]. Já os conservantes naturais, obtidos de extratos vegetais e óleos essenciais, têm vindo a assumir maior destaque devido à crescente preferência dos consumidores por produtos mais naturais, “limpos” e sustentáveis, assegurando simultaneamente uma ação antimicrobiana eficaz [7, 15, 16].

1.3.4. Doseamento e métodos analíticos

A persistência de conservantes representa um desafio ambiental, uma vez que os tratamentos de águas residuais não removem eficazmente estes compostos, caracterizados pela estabilidade, atividade bactericida e baixa biodegradabilidade, podendo afetar ecossistemas aquáticos [17].

Deste modo, determinação de conservantes, predominantemente realizada em produtos farmacêuticos, cosméticos e genéricos alimentícios, constitui uma prática comum no desenvolvimento e controlo da qualidade do produto final e no desenvolvimento de formulações cosméticas de carácter ecológico, sendo também uma exigência regulamentar.

Os métodos analíticos aplicados devem permitir extrair, separar e dosear simultaneamente diferentes conservantes em diversas matrizes, assegurando a eliminação de potenciais interferências [11, 18, 19]

1.3.5. Regulamentação em cosméticos

Os produtos cosméticos desempenham um papel fundamental na saúde e bem-estar dos consumidores [20]. Certos cosméticos, para além de melhorarem o aspeto da pele, também contribuem para a saúde, especialmente através da sua ação antioxidante [9].

O setor cosmético beneficiou de avanços tecnológicos, inovação científica, promoção da segurança e maior transparência, tornando-se e mantendo-se um pilar relevante da economia europeia e global [4,21].

A regulamentação dos cosméticos baseia-se no Regulamento (CE) n.º 1223/2009, aplicável diretamente em todos os Estados-Membros da UE, que introduziu requisitos rigorosos de segurança, rastreabilidade, avaliação toxicológica e proibição de testes em animais [2, 21, 22]. A existência de legislação e de mecanismos de controlo da qualidade permitem regular a inspeção de produtos de cosmética já presentes no mercado, assim como daqueles que estão em processo de entrada. Neste contexto, tem-se defendido uma maior exigência na admissão de novas substâncias com possível toxicidade na composição dos cosméticos, de forma a salvaguardar a saúde humana [8].

Este regulamento estabelece ainda mecanismos de cosmetovigilância, que devem ser implementados, tanto pelos responsáveis pelos produtos, como pelas autoridades competentes, como é o caso do INFARMED em Portugal. Embora existam sistemas estruturados para a notificação de efeitos adversas, a sua eficácia depende fortemente da colaboração entre profissionais de saúde, consumidores e fabricantes. É de salientar que nem todos os países dispõem de regulamentações tão exigentes quanto a União Europeia; em diversos países em desenvolvimento, os sistemas de vigilância são inexistentes ou pouco eficazes. A nível global, a harmonização internacional permanece limitada, apesar dos esforços de entidades como a OMS [2].

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 – Artigo 2.º, um produto cosmético e os conservantes são definidos como, respetivamente:

“qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais” (Regulamento (CE) n.º 1223/2009, Art. 2.º, n.º 1).

“substâncias cuja principal ou exclusiva função consiste em impedir o crescimento de microrganismos no produto cosmético” (Regulamento (CE) n.º 1223/2009, Art. 2.º, n.º 1).

O Regulamento (CE) nº 1223/2009 dedica-se também a substâncias específicas. Neste sentido, destacam-se os artigos que impõem restrições e condições de utilização, assegurando que as substâncias com potencial risco sejam devidamente controladas. O Artigo 14.º define limites à utilização de determinadas substâncias, quanto ao Artigo 15.º aborda especificamente os compostos classificados como carcinogénicos, mutagénicos ou tóxicos para a reprodução (CMR) – alguns parabenos foram alvo de restrições devido a potenciais efeitos hormonais. Por sua vez, o Artigo 19.º define os requisitos de rotulagem, permitindo que os consumidores tenham acesso a informação sobre a presença de ingredientes com possibilidade para causar efeitos adversos [2].

No caso concreto dos conservantes, o Anexo V do Regulamento (CE) nº 1223/2009 apresenta uma lista positiva de substâncias autorizadas, acompanhada pelos respetivos limites de concentração, condições de uso e categorias de produtos em que podem ser aplicadas. Esta listagem consiste numa ferramenta essencial que procura garantir que os conservantes, ainda que essenciais para a estabilidade microbiológica dos cosméticos, sejam utilizados de forma controlada e dentro de margens consideradas seguras para a saúde humana. Todos os conservantes podem ser utilizados, contudo de forma limitada, à exceção do isopropilparabeno e do isobutilparabeno, cuja presença é proibida, que constam no Anexo II do Regulamento [2]. Exemplos recentes incluem novos ingredientes na lista negra e a revisão dos limites legais de outros, em consequência de pareceres emitidos pelo Comité Científico para a Segurança dos Consumidores (SCCS) [23].

1.3.6. Conservantes estudados

No âmbito do presente projeto, consideraram-se onze conservantes em produtos cosméticos – *aftershaves*. Cada um destes compostos apresenta propriedades físico-químicas e microbiológicas distintas, refletindo-se na sua aplicação, eficácia e segurança. Posteriormente, procede-se à caracterização individual de cada conservante, destacando as suas principais funções, limites legais estabelecidos pelo Regulamento (CE) n.º 1223/2009 e outras propriedades relevantes. Os conservantes estudados são: fenoxietanol, ácido benzóico, ácido sórbico, clorhexidina, clorfenesina e parabenos – metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isopropilparabeno e isobutilparabeno.

1.3.6.1. Fenoxietanol

O fenoxietanol atua como conservante ao danificar as membranas celulares dos microrganismos, provocando a fuga de iões K^+ em espécies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*. Pode também inibir diretamente a síntese microbiana de DNA e RNA. Apesar da sua atividade microbiana, isoladamente não garante a preservação de cosméticos, sendo habitualmente combinado com outros potenciadores ou multifuncionais – como parabenos – para assegurar um efeito de amplo espectro [7].

Apresenta propriedades tecnológicas relevantes, especialmente: baixa volatilidade (atua como estabilizador e prolonga o prazo de validade das formulações), solubilidade em água e óleo (permite a sua aplicação em diferentes tipos de produtos – cremes, loções e sérums) e baixo potencial de irritação ou sensibilidade cutânea. A Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA) não o classifica como sensibilizador da pele, embora em alguns casos possam ocorrer reações adversas, como sensação de ardor [7].

O limite legal na UE é de 1,0% (m/m) e a sua exposição excessiva em crianças deve ser evitada [2].

1.3.6.2. Ácido benzóico

O benzoato de sódio é um conservante amplamente utilizado na preservação de alimentos, sendo igualmente aplicado em cosméticos e produtos farmacêuticos, com a finalidade de promover a conservação e inibir o desenvolvimento de leveduras, bolores, sendo menos ativos contra bactérias. A sua atividade conservante é particularmente eficaz em meios ácidos [11,17].

O ácido benzóico, um ácido aromático naturalmente presente em diversas plantas, é utilizado como regulador de pH e conservante em produtos de cosmética, incluindo os ecológicos, devido à sua classificação como idêntico ao natural. Dada a sua baixa solubilidade em água, é normalmente aplicado sob a forma de benzoato de sódio, podendo ser combinado com outros conservantes. Este juntamente com os seus sais e o éster etílico integram a lista de conservantes autorizados em produtos de cosmética, incluindo os de carácter orgânico [19].

O limite máximo permitido é de 0,5% (m/m) (ácido). É considerado seguro, mas pode causar irritação em pele sensível ou mucosas [2].

1.3.6.3. Ácido Sórbico

O ácido sórbico é um conservante habitualmente utilizado em produtos cosméticos ecológicos, sendo empregue como idêntico ao natural ou obtido diretamente a partir de plantas. De forma generalizada, o ácido sórbico é utilizado na forma de sal de potássio – o sorbato de potássio [19].

Trata-se de um composto utilizado com elevada frequência como conservante nos setores alimentar, farmacêutico e cosmético, sendo aplicado sobretudo como aditivo alimentar, inibindo o crescimento de bolores. [17] Este composto e os seus sais integram a lista de conservantes de uso condicionado permitidos em cosméticos, incluindo os orgânicos [19].

O limite máximo é de 0,6% (m/m) (ácido). Apresenta um bom perfil toxicológico, sendo bem tolerado, embora ocasionalmente possa provocar irritação [2].

1.3.6.4. Clorhexidina

A clorhexidina possui ação bactericida e fungicida. É utilizada, tanto em produtos cosméticos, como desinfetante em saúde [2]. Apresenta, do ponto de vista analítico, desafios consideráveis, pelo facto de se degradar facilmente em solução.

O limite máximo em cosméticos é de 0,3% (m/m). Pode causar reações alérgicas e, em raros casos, efeitos adversos graves, motivo pelo qual a sua utilização é estritamente regulamentada [2].

1.3.6.5. Clorfenesina

A clorfenesina é um conservante sintético utilizado em produtos de cuidados de pele, dada a sua eficácia contra fungos e algumas bactérias [2].

O limite máximo permitido é de 0,3% (m/m). Apesar de raros, existem casos de irritação e reações alérgicas descritos [2].

1.3.6.6. Parabenos

Os parabenos são éteres alquílicos do ácido parahidroxibenzóico geralmente utilizados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Constituem conservantes sintéticos que são amplamente utilizados pela sua eficácia antimicrobiana em produtos de cosmética. É uma prática corrente incluir múltiplos parabenos num mesmo produto cosmético [7].

Nos últimos anos, tem-se atribuído maior relevância à análise quantitativa e qualitativa dos parabenos, em virtude das reações alérgicas que lhes são associadas. Estudos prévios evidenciam ainda a sua atividade estrogénica, com impacto na produção de testosterona e na função do sistema reprodutor feminino. Adicionalmente, a exposição prolongada a parabenos, mesmo em baixas concentrações, pode conduzir à acumulação em tecidos biológicos, podendo influenciar o crescimento e desenvolvimento de tecidos cancerígenos, especialmente o cancro da mama [11, 17, 24].

Os parabenos são valorizados nas formulações cosméticas por apresentarem características como ausência de odor ou sabor perceptível, pH neutro, e por não provocarem alterações de cor nem endurecimento do produto. A sua ampla utilização em cosméticos e produtos de higiene pessoal deve-se, sobretudo, à baixa toxicidade, amplo espectro de ação antimicrobiano, perfil inerte, custo reduzido e fácil incorporação, à aceitação regulatória global, à boa tolerância cutânea e à biodegradabilidade [9, 25 – 30].

É de salientar ainda a sua estabilidade química, que permanecer eficaz numa gama de pH (entre 4,5 e 7,5) e elevadas temperaturas, permitindo que os produtos contendo parabenos sejam submetidos a processos como a esterilização por autoclave sem perda significativa da atividade conservante devido à hidrólise [9].

A toxicidade dos parabenos é geralmente reduzida, uma vez que são rapidamente metabolizados no organismo, sendo hidrolisados (hidrólise in vivo) ao ácido correspondente, que é prontamente conjugado e eliminado. Embora a atividade antimicrobiana aumente com o alongamento da cadeia alquílica, do metilo ao n-butilo, na prática, predominam os ésteres de cadeias mais curtas, como o metilparabeno, devido à sua maior solubilidade em água comparativamente aos parabenos de cadeias mais longas [9].

Apresentam elevada permeabilidade cutânea e são considerados potenciais perturbadores endócrinos, devido à sua capacidade de replicar os estrogénios – principal hormona sexual feminina, podendo afetar as funções do sistema reprodutor masculino [5, 8].

Por outro lado, ao serem aplicados na pele e absorvidos pelo organismo, os parabenos presentes nos cosméticos evitam o metabolismo normal, atravessando a corrente sanguínea e alcançando diversos órgãos. Estes compostos têm sido relacionados com efeitos prejudiciais à saúde, incluindo o desenvolvimento de cancro e neurotoxicidade [5, 8].

Desta forma, os parabenos – metilparabeno e etilparabeno – são mais solúveis em água, enquanto o propilparabeno e butilparabeno têm uma maior potência antimicrobiana [9].

Contudo, órgãos reguladores – Comissão Europeia - estabeleceram restrições específicas ao uso de propilparabeno e butilparabeno em cosméticos, sobretudo em produtos cujo destinatário são crianças. Tais limitações baseiam-se em estudos que demonstram o potencial de determinados parabenos se armazenarem no organismo por duração prolongada e afetar a função endócrina [7].

1.3.6.6.1. Metilparabeno

O metilparabeno trata-se de um sólido que pode surgir sob a forma de cristais incolores/transparentes ou de pó branco cristalino, praticamente inodoro, leve odor característico e um gosto ardente ligeiro. Possui baixa solubilidade em água [31].

Destaca-se entre os parabenos, sendo considerado o mais utilizado, devido ao seu vasto espectro antimicrobiano ou atividade antibacteriana e à sua capacidade de preservar as propriedades físico-químicas dos produtos finais, nomeadamente sabor, odor, cor ou consistência. A sua aplicação estende-se a alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos [11, 17].

Pode causar toxicidade no desenvolvimento e na reprodução, normalmente presentes em produtos de cosmética: champôs, protetores solares e vernizes [3]. A sua aplicação dérmica pode interagir com outras substâncias químicas, contribuindo para o aumento do envelhecimento da pele e danos no DNA [5, 8, 32].

Os limites legais variam conforme combinação com outros parabenos, sendo o máximo individual de 0,4% (m/m) e em conjunto com outros de 0,8% (m/m) (ambos em ácido) [2].

1.3.6.6.2. Etilparabeno

O etilparabeno apresenta propriedades e limites de utilização semelhantes ao metilparabeno e é geralmente utilizado em combinação com outros parabenos para um espectro antimicrobiano alargado. O perfil tóxico é sobreponível ao do metilparabeno [2].

Os limites legais variam conforme combinação com outros parabenos, sendo o máximo individual de 0,4% (m/m) e em conjunto com outros de 0,8% (m/m) (ambos em ácido) [2].

1.3.6.6.3. Propilparabeno e Butilparabeno

O propilparabeno e butilparabeno manifestam uma fraca atividade estrogénica, afetando a secreção de testosterona e a função do sistema reprodutor masculino [9]. Podem causar toxicidade no desenvolvimento e na reprodução, normalmente presentes em produtos de cosmética: champôs, protetores solares e vernizes [3].

Para o propilparabeno existem restrições adicionais sobre a utilização em produtos para crianças devido a preocupações com potenciais perturbações endócrinas. Relativamente ao butilparabeno, é caracterizado por um perfil tóxico semelhante aos anteriores, com discussão recente sobre a atividade hormonal [2].

Em produtos *leave-on* destinados à área da fralda de bebés com menos de três anos, propilparabeno e butilparabeno estão proibidos [2].

O limite máximo (em ácido) para a soma das concentrações individuais é de 0,14% (m/m); e para as misturas destas duas substâncias mais metilparabeno e etilparabeno é de 0,8% (m/m) [2].

1.3.6.6.4. Isopropilparabeno e Isobutilparabeno

O isopropilparabeno e o isobutilparabeno não estão autorizados para o uso em cosmética na UE. Ou seja, correspondem a conservantes proibidos em produtos de cosmética [2].

A fórmula química estrutural dos compostos encontra-se representada na Figura 3.

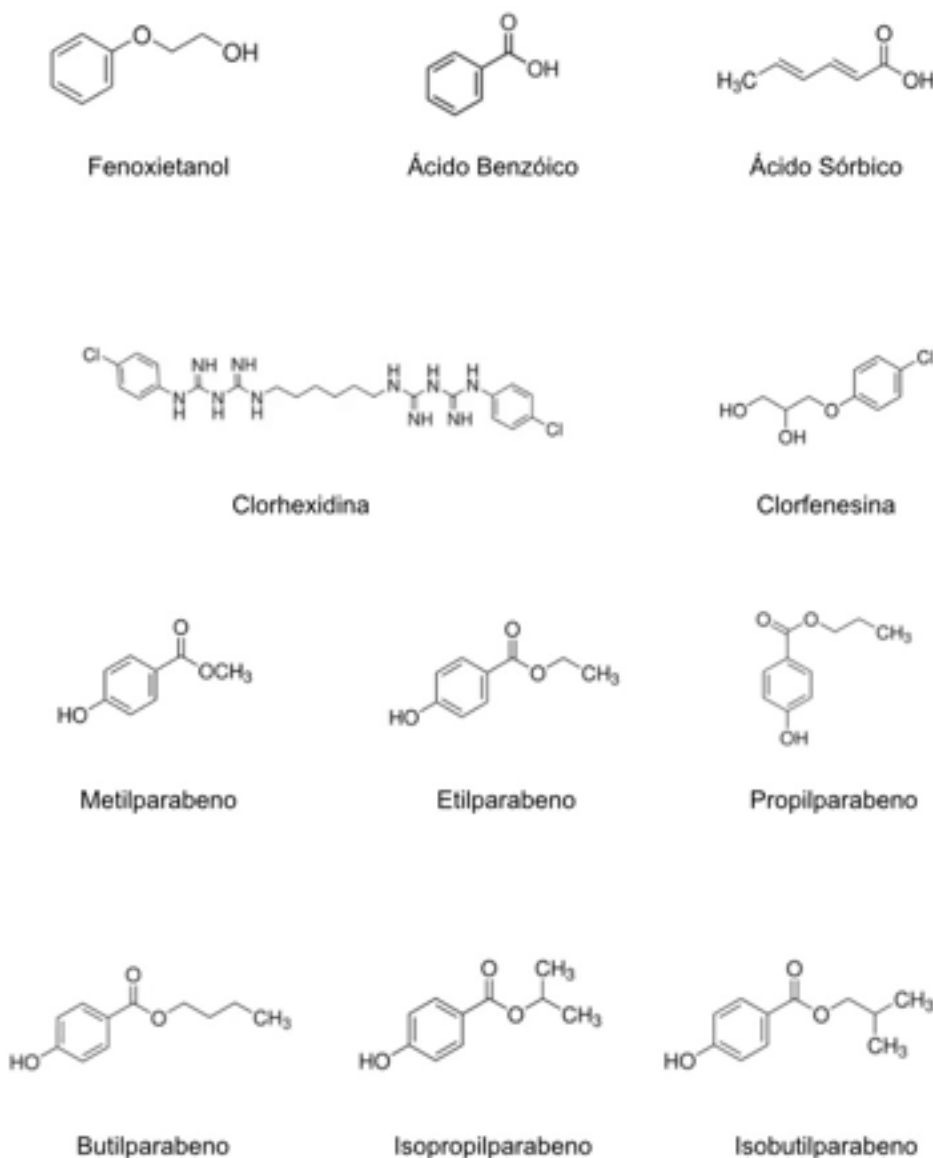


Figura 3. Fórmula química estrutural dos conservantes doseados (adaptado de Merck KGaA, n.d., Sigma-Aldrich) [33].

1.4. Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica analítica que permite a separação, identificação e doseamento de componentes individuais presentes em misturas complexas. O seu princípio fundamental baseia-se na interação diferencial dos analitos entre uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida, resultando em tempos de retenção (t_R) distintos para cada composto. Deste modo, os analitos com menor interação com a fase estacionária eluem em primeiro lugar, enquanto os que apresentam maior afinidade permanecem mais retidos na coluna, emergindo posteriormente [34].

A amostra é introduzida na fase móvel, que migra ao longo da coluna preenchida com a fase estacionária, normalmente constituída por partículas sólidas de natureza polar e hidrofílica, como a sílica [35]. A LC pode ser classificada em diferentes modalidades, dependendo da polaridade relativa das fases utilizadas.

Na fase normal, a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar (solventes orgânicos “fracos”, como hexano, heptano e cloreto de metileno). Na fase reversa, a mais utilizada atualmente, a fase estacionária é apolar (geralmente constituída por sílica modificada com cadeias alquílicas hidrofóbicas – C18) e a fase móvel é polar (solventes polares: água – solvente “fraco” – e metanol ou acetonitrilo (ACN) – solventes “fortes”). A maior estabilidade e resistência das colunas apolares justificam a predominância do modo de fase reversa na maioria das aplicações analíticas [36].

A Figura 4 ilustra a diversidade de compostos de acordo com a sua polaridade, desde estruturas polares até estruturas apolares.

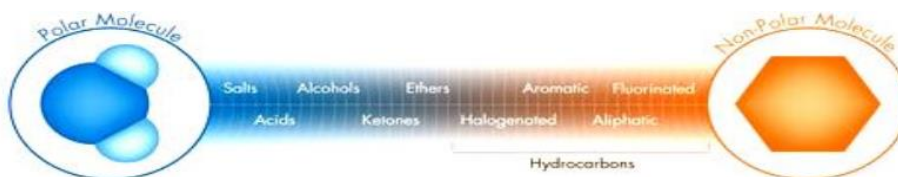


Figura 4. Distribuição de diferentes classes de compostos ao longo de um gradiente de polaridade, desde moléculas altamente polares até moléculas apolares.

A ampla aplicação da LC deve-se à sua versatilidade, precisão e fiabilidade, sendo utilizada em áreas como a química, a biologia, a medicina e a ciência forense. Para além de um método rápido e sensível, requer pequenas quantidades de amostra, evita a

decomposição de compostos e apresenta um caráter não destrutivo, permitindo a recuperação da amostra após a análise [34].

1.4.1. HPLC vs. UPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*) amplamente utilizada em laboratórios analíticos desde a década de 1970, é caracterizada pela utilização de partículas de coluna com diâmetros típicos entre 3-5 μm e pressões operacionais até cerca de 6000 psi. Por outro lado, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – *Ultra-Performance Liquid Chromatography*), introduzido em 2004, representa uma evolução tecnológica, recorrendo a partículas de dimensão inferior a 2 μm e a pressões que podem atingir 15.000 psi. Estas características resultam em maior resolução; picos mais estreitos, altos e simétricos (menos *tailing*); tempos de análise reduzidos e maior eficiência cromatográfica [35, 37, 38].

O diâmetro das partículas da fase estacionária influencia diretamente a eficiência da separação cromatográfica. Partículas de menor dimensão proporcionam maior área de contacto e empacotamento mais denso, o que aumenta a pressão do sistema, mas resulta numa separação mais eficiente, como ocorre no UPLC. Em contrapartida, partículas de maior dimensão originam menor eficiência, traduzindo-se em resoluções inferiores [36, 39].

Ambos os sistemas podem operar em modo isocrático, caracterizado por uma composição constante da fase móvel, ou em modo gradiente, no qual ocorre uma variação programada da sua composição ao longo da corrida cromatográfica. Este último é particularmente vantajoso na análise de misturas complexas (como os conservantes em cosméticos), otimizando a separação e reduzindo os tempos de análise [10].

O sistema de ambas as técnicas integra os principais componentes: reservatórios de solvente, bomba, injetor automático, coluna cromatográfica, forno para controlo da temperatura – que mantém a coluna na temperatura definida, prevenindo a degradação da amostra e assegurando a reprodutibilidade –, diferentes tipos de detetores (UV, MS/MS, PDA/DAD) e um sistema de aquisição de dados. Para melhor compreensão da técnica, a Figura 5 apresenta de forma esquemática a disposição destes componentes num sistema de LC, tal como o utilizado no presente trabalho [35].

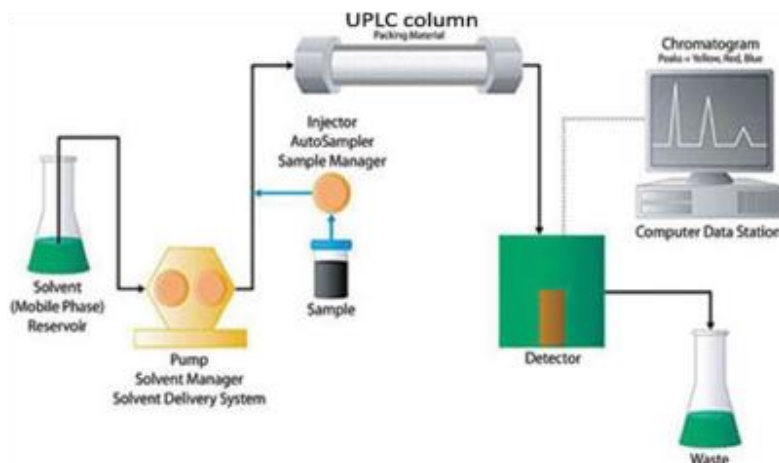


Figura 5. Esquema simplificado de um sistema de cromatografia líquida (UPLC), composto por reservatório da fase móvel, bomba, injetor, coluna, detetor e estação de dados. No presente trabalho, recorreu-se a um sistema UPLC-PDA.

O UPLC dispõe de mecanismos automáticos de purga, que permitem eliminar possíveis bolhas de ar nos canais e assegurar o correto funcionamento do sistema – uma funcionalidade ausente no HPLC, que utiliza diretamente a fase móvel para a limpeza inicial dos canais [35, 36].

Entre as principais vantagens do UPLC, destacam-se a maior velocidade e sensibilidade analítica, associadas à redução do consumo de solventes e do desgaste do sistema. Estas características assumem particular relevância no controlo da qualidade de produtos cosméticos, em que a eficiência e a rapidez da análise são essenciais para assegurar a conformidade com os requisitos legais de segurança estabelecidos pelo Regulamento (CE) n.º 1223/2009. Contudo, esta tecnologia implica custos superiores e requer manutenção especializada, bem como maior exigência na robustez dos materiais utilizados [2, 10, 18, 40]. Devido aos seus benefícios, o UPLC é atualmente considerado uma ferramenta indispensável em laboratórios analíticos modernos, com aplicações relevantes nas áreas da química, biomédica e farmacêutica [34, 39].

A principal limitação do UPLC, face ao HPLC, prende-se com a elevada contrapressão, o que reduz a vida útil das colunas. Além disso, as partículas com diâmetro inferior a 2 µm não são regeneráveis, o que condiciona o seu tempo de utilização [39].

A escolha do UPLC, contrariamente ao HPLC, justifica-se pela superioridade técnica demonstrada, nomeadamente o aumento da eficiência cromatográfica obtida pela utilização de partículas de menor dimensão e a capacidade de operar em pressões mais elevadas. Esta metodologia traduz-se uma redução significativa do tempo e do consumo de solventes, promovendo uma análise mais sustentável e economicamente viável [34, 39].

1.4.2. Detetores em cromatografia líquida

Os detetores mais comuns em LC incluem o detetor de ultravioleta e o detetor de arranjo de fotodíodos (PDA – *Photodiode Array Detector*), também designado na literatura como detetor de arranjo de díodos (DAD – *Diode Array Detector*). O detetor UV regista a absorvância a um comprimento de onda fixo. Já os detetores PDA/DAD permitem a aquisição simultânea de sinais em múltiplos comprimentos de onda, fornecendo espectros completos que possibilitam avaliar a pureza dos picos [10, 39].

O acoplamento da LC a técnicas de deteção avançadas, como a espectrometria de massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN), constitui atualmente uma abordagem de referência, aumentando a eficiência e a precisão na identificação de compostos. A RMN, apesar da baixa sensibilidade, permite obter informações estruturais detalhadas que não são acessíveis por outros detetores [39].

A deteção por espectrometria de massa (MS) pode assumir diferentes configurações, sendo as mais comuns o modo simples (MS) e o modo tandem (MS/MS). No modo MS, a análise limita-se à determinação da razão massa/carga (m/z) dos iões, sem contemplar a etapa de fragmentação, o que resulta numa seletividade inferior. Já o detetor por MS/MS baseia-se na fragmentação dos iões moleculares através de dissociação induzida por colisão, originando fragmentos característicos que aumentam a seletividade do método. Esta última técnica apresenta elevada seletividade e menor suscetibilidade a efeitos de matriz, resultando no aumento da relação sinal/ruído em comparação com a deteção por UV [39, 41]. Contudo, não se selecionou este detetor no método de ensaio utilizado, por não se adequar aos objetivos do presente projeto.

Para além do PDA e da espectrometria de massa (MS ou MS/MS), encontram-se outros detetores que podem ser acoplados a sistemas LC, tais como o de espalhamento de luz evaporativo (ELSD), o infravermelho (IR), o eletroquímico e o de fluorescência

[38]. No entanto, não se selecionaram estas alternativas, por não se adequarem aos objetivos definidos nem às características do método em estudo.

Por conseguinte, o detetor PDA caracteriza-se pela capacidade de registar, em tempo real, o espectro de absorção na região UV/Vis (190 – 700 nm) para cada pico cromatográfico. Esta característica permite avaliar a pureza espectral dos analitos, possibilitando a identificação de compostos coeluídos e aumentando a seletividade analítica [37, 42]. Pela sua versatilidade, constitui um dos detetores mais utilizados em LC, permitindo ainda a comparação dos espectros obtidos com bibliotecas de referência [35,36,39].

Deste modo, selecionou-se o detetor PDA como o mais adequado ao presente projeto, atendendo às suas vantagens de seletividade, disponibilidade e aplicabilidade na determinação de conservantes em produtos cosméticos.

1.4.3. UPLC-PDA

O UPLC-PDA é aplicado em diferentes áreas da investigação e do controlo da qualidade, com especial destaque para a análise de cosméticos [38, 39].

O UPLC-PDA apresenta o aumento da resolução dos picos cromatográficos, na maior sensibilidade analítica, em tempos de análise reduzidos e em maior rendimento analítico. Paralelamente, proporciona melhorias de desempenho associadas a avanços nas colunas cromatográficas e na instrumentação [35].

Nos sistemas UPLC, é comum recorrer à utilização de uma pré-coluna, sobretudo devido à elevada contrapressão que reduz a vida útil das colunas. A pré-coluna atua como filtro, retendo partículas residuais, impurezas ou interferentes provenientes da matriz ou da fase móvel, prolongando assim a durabilidade da coluna principal. Esta medida contribui para a robustez do sistema e para a consistência dos resultados cromatográficos [35, 36].

No presente trabalho, utilizou-se o modo gradiente no UPLC-PDA. Em comparação com o sistema isocrático, o gradiente permite separar compostos de diferentes polaridades numa única corrida cromatográfica, reduzindo o tempo de análise e melhorando a resolução dos picos. Esta abordagem conduz a picos estreitos, simétricos e resolvidos segundo os critérios de adequabilidade do sistema (*system suitability*), minimizando fenómenos de coeluição, arrastamento e assimetria dos picos (*fronting* ou

tailing). Além disso, a variação programada da composição da fase móvel permite otimizar a separação de múltiplos componentes em menos tempo, tornando o tratamento de dados mais eficiente [36].

A combinação do sistema UPLC com o detetor PDA constitui uma solução analítica robusta para o doseamento simultâneo de múltiplos conservantes, oferecendo elevada resolução, rapidez, excelente sensibilidade e consumo reduzido de solventes – fatores cruciais para matrizes complexas e regulamentadas, garantindo conformidade legal, a qualidade e segurança dos produtos, bem como a proteção da saúde do consumidor [10, 39, 43].

Assim, o método UPLC-PDA selecionado para esta dissertação demonstra-se como uma ferramenta ideal para assegurar a qualidade, validade e conformidade dos produtos cosméticos face às normas de segurança e proteção dos consumidores, revelando-se uma tecnologia robusta, inovadora e adequada ao controlo rigoroso da presença de conservantes em amostras cosméticas complexas.

1.5. Validação do método

A validação de métodos analíticos constitui uma exigência regulamentar, estando prevista em diferentes normas e documentos de referência internacionais. Entre estes destacam-se a norma ISO 12787:2011, a ISO/IEC 17025, a ICH Q2 (R1), o *Guideline on Bioanalytical Method Validation* e o guia nacional RELACRE 13, documentos que estabelecem os requisitos fundamentais de validação e asseguram que os métodos aplicados em laboratório apresentam desempenho validado e resultados consistentes. Em particular, a ISO/IEC 17025 estabelece que a validação é obrigatória em métodos não normalizados, desenvolvidos internamente, aplicados fora do seu âmbito ou sujeitos a modificações [43], [44].

Recorreu-se, maioritariamente, aos critérios estabelecidos no procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P., baseada na Farmacopeia Europeia [45].

A validação do método visa demonstrar que um determinado procedimento analítico é adequado para o fim a que se destina, garantindo a robustez, a fiabilidade e a qualidade dos resultados obtidos [46 – 48]. Esta pode ser complementada pela verificação contínua do desempenho do método, permitindo o controlo da qualidade analítica ao longo da sua aplicação [49].

A aplicação do método a diferentes matrizes em contexto de rotina exige a recolha sistemática de dados suplementares de controlo da qualidade e validação, incluindo calibração e ensaios de recuperação [49]. Neste enquadramento, a necessidade de validação surge no desenvolvimento de novos métodos, na adaptação de metodologias previamente validadas, na introdução de técnicas adicionais ou na utilização de equipamentos diferentes [50].

Importa, ainda, reconhecer que a realização de um estudo de validação confere benefícios adicionais ao laboratório, proporcionando conhecimento aprofundado e experiência prática relativa na execução do método, permitindo identificar etapas críticas do procedimento. Paralelamente, reforça-se a confiança do laboratório e dos seus técnicos na fiabilidade dos resultados obtidos [48].

Os parâmetros de validação de métodos analíticos são os seguintes: Seletividade/Especificidade, Função da Resposta (gráfico analítico), Linearidade, Exatidão, Precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade), Sensibilidade, Efeito de Matriz, Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ) e Robustez. São essenciais para garantir a conformidade do desempenho e a consistência dos resultados analíticos [50 – 52].

No presente trabalho, a validação incidiu sobre os parâmetros linearidade, repetibilidade, exatidão e limites de deteção e quantificação, tendo-se adotado os critérios definidos no método de ensaio e nos procedimentos internos utilizados no laboratório do INFARMED, I.P. A adequabilidade do sistema, embora considerada nos guias internacionais, não constituiu alvo de avaliação específica, por se encontrar abrangida pelas rotinas internas de controlo do equipamento.

1.5.1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de um método analítico em obter resultados de teste diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo específico [46, 47]. A sua avaliação é geralmente realizada através da construção de curvas de calibração, estabelecendo a relação entre a resposta do detetor e a concentração do analito.

Para a verificação deste parâmetro, podem ser considerados diferentes critérios estatísticos, como a análise de resíduos e o coeficiente de correlação (R^2), um dos

indicadores mais utilizados na validação [50,51]. Recomenda-se, em geral, a obtenção de valores de R^2 iguais ou superiores a 0,990, bem como a avaliação do desvio relativo (*bias*) de cada ponto da curva através da análise dos resíduos da regressão linear [47]. Importa salientar que, embora o R^2 seja amplamente aplicado, não constitui, por si só, evidência de linearidade, devendo ser complementado com outros ensaios adequados [51].

No presente trabalho, avaliou-se a linearidade com base nas curvas de calibração obtidas, nomeadamente na avaliação do coeficiente de correlação e dos residuais, considerando os critérios definidos nos procedimentos internos e no método de ensaio utilizado.

1.5.2. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método analítico quando ensaios independentes são realizados em condições idênticas, nomeadamente com o mesmo operador, o mesmo equipamento, os mesmos reagentes e em curtos intervalos de tempo [46, 47, 50, 51].

Este parâmetro corresponde ao nível de precisão em que se observa a menor variabilidade, sendo avaliada através de medições repetidas realizadas no mesmo dia e em condições experimentais controladas. Em contraste, a precisão intermédia considera variações adicionais, como diferentes operadores, reagentes, equipamentos ou dias de análise, representando, assim, um parâmetro distinto [53].

Os critérios de aceitação associados à repetibilidade não se encontram definidos de forma universal, variando com a natureza do método e da matriz. Contudo, em métodos cromatográficos de rotina, valores de desvio padrão relativo (RSD) entre 2–5% são geralmente considerados aceitáveis.

Neste caso, avaliou-se a repetibilidade com base em injeções sucessivas de uma mesma solução padrão, considerando os critérios definidos no método de ensaio.

1.5.3. Exatidão

A exatidão (*accuracy*) corresponde ao grau de proximidade entre o resultado obtido num ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro, geralmente estabelecido por Materiais de Referência Certificados (MRC) [46, 47, 51, 53]. Este parâmetro integra

componentes de erro sistemático e aleatório, sendo habitualmente avaliado através de ensaios de recuperação, em que amostras são fortificadas com quantidades conhecidas do analito e os valores medidos são comparados com os valores teóricos previamente definidos [51].

De acordo com diversos guias internacionais, são considerados aceitáveis valores médios de recuperação no intervalo de 70–120%, com coeficiente de variação até 20% [50, 54].

Procedeu-se à avaliação da exatidão com base em ensaios de recuperação realizados a diferentes níveis de concentração, considerando os critérios definidos no método de ensaio e no procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P.

1.5.4. Limite de Detecção e Quantificação (LOD e LOQ)

Na validação de métodos analíticos, a determinação dos limites analíticos constitui um parâmetro essencial de sensibilidade. O LOD corresponde à menor concentração de analito que pode ser detetada, distinguindo-se do sinal do branco para um determinado nível de confiança estatística. Trata-se, portanto, da concentração mínima que origina um sinal significativamente diferente do ruído de fundo, ainda que não permita uma quantificação precisa. Por sua vez, o LOQ define a menor concentração que pode ser determinada de forma quantitativa, com níveis aceitáveis de precisão e exatidão [46, 47, 51].

Na prática, estes parâmetros podem ser determinados através de diferentes abordagens, incluindo cálculos baseados no desvio padrão da resposta (obtidos a partir do branco ou da curva de calibração) ou pela razão sinal/ruído (S/N); esta última consiste na comparação entre o sinal obtido em amostras com baixas concentrações do analito e o ruído medido no branco. Geralmente considerados valores de S/N de 3 e de 10 para o LOD e o LOQ, respetivamente [50, 51].

Para este estudo, procedeu-se à determinação do LOD e do LOQ com base na razão S/N, em conformidade com os critérios estabelecidos no método de ensaio e no procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P.

1.6. Objetivos do Projeto

O presente trabalho teve como objetivo geral a validação de um método por UPLC-PDA para a determinação de conservantes em produtos cosméticos. A validação delineou-se de modo a assegurar o desempenho adequado do método face à sua finalidade, garantindo resultados fiáveis e reprodutíveis em conformidade com os critérios definidos em normas internacionais e nos procedimentos internos do INFARMED.

Neste contexto, avaliaram-se parâmetros de desempenho analítico considerados essenciais, nomeadamente a linearidade, a exatidão, a repetibilidade e os limites de deteção e de quantificação, confirmando a robustez do método para aplicação prática. Numa fase posterior, aplicou-se o método à análise de cinquenta amostras de *aftershaves* comercializadas em Portugal, abrangendo vinte e uma marcas distintas.

O objetivo final consistiu em verificar a conformidade dos teores de conservantes determinados com os limites estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 1223/2009, bem como avaliar a correspondência entre a informação declarada na rotulagem e a composição efetivamente detetada em laboratório. Assim, o trabalho permitiu evidenciar a relevância do controlo laboratorial na monitorização do cumprimento regulamentar, contribuindo para a qualidade dos produtos cosméticos, a proteção da saúde pública e a confiança do consumidor, além de fornecer uma interpretação crítica dos resultados com vista à identificação de eventuais não conformidades.

2. Parte Experimental

2.1. Metodologia

O procedimento experimental desenvolvido neste trabalho contemplou todos os elementos necessários à execução do projeto. Nesta secção apresentam-se, de forma sistemática, as etapas fundamentais do estudo, incluindo a descrição dos equipamentos, materiais e reagentes utilizados, as condições cromatográficas aplicadas e os processos de preparação das soluções, padrões e amostras.

2.1.1. Equipamentos e Materiais

Na realização deste projeto utilizou-se o cromatógrafo líquido de ultra eficiência, WATERS, modelo ACQUITY UPLC QSM, ou seja, o sistema UPLC-PDA *Acquity Waters*®, disponível na Unidade Laboratorial de Química e Tecnologia Farmacêuticas do INFARMED, composto por um injetor (*autosampler*), um desgaseificador, uma válvula GPV, uma bomba quaternária, um forno de colunas e um detetor PDA, todos da marca *Acquity Waters*®. Os dados adquiriram-se e trataram-se no *software Empower 3*.

Sempre que necessário, recorreu-se ao sistema de água ultrapura Milli-Q® (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$; TOC $\leq 5 \text{ ppb}$), adequado a métodos cromatográficos a $\lambda < 230 \text{ nm}$ e a gradientes. Utilizaram-se ainda um banho de ultrassons, uma placa de agitação magnética, um *vórtex*, um potenciómetro e um sistema de filtração a vácuo (KNF *Vacuumcontroller*, *Neuberger*®).

Quanto a materiais, utilizaram-se balões volumétricos (5,00-5000 mL), pipetas volumétricas (1,000-20,00 mL), micropipetas (100, 200 e 1000 μL), provetas (25-2000 mL); funis, *goblets* e copos de plástico; filtros PTFE 0,45 μm , seringas (1, 5 e 10 mL), frascos *Schott* (1000, 2000 e 5000 mL), *vials* de 1,5 mL, barquinhas de pesagem, colheres/espátulas, pompets, barras magnéticas e pipetas de *Pasteur*.

As massas determinaram-se com uma balança de precisão (resolução de 0,01 g) e uma balança analítica (resolução de 0,00001 g), *Mettler Toledo*®, com impressora associada. A Figura 6 apresenta a fotografia balança analítica utilizada durante o estágio.



Figura 6. Fotografia da balança analítica utilizada ao longo do estágio.

2.1.2. Reagentes e Padrões

Para a execução experimental deste projeto, utilizaram-se os seguintes reagentes: o acetonitrilo (99,9%) de *PanReac AppliChem*, Barcelona e o di-hidrogenofosfato de sódio anidro ($\geq 99,0\%$) de *Sigma- Aldrich*, Portugal, ambos destinados à preparação dos eluentes; o metanol (99,9%) de *PanReac AppliChem*, Barcelona, utilizado na fase móvel e na solução de limpeza; e o ácido fosfórico ($\text{H}_3\text{PO}_4 \geq 85\%$) de *Honeywell Fluka*, Suíça, empregado no eluente e na solução extração.

Relativamente aos padrões dos conservantes, utilizaram-se os seguintes compostos: o fenoxietanol de pureza 99,9%; o benzoato de sódio de pureza 99,7%, sendo o teor em ácido benzóico, que é o que pretendemos dosear, de 84,446%; o ácido sórbico de pureza 99,9%; a clorhexidina de pureza 95,4%; a clorfenesina de pureza 99,82%; o metilparabeno de pureza 99,9%; o etilparabeno de pureza 99,99%; o propilparabeno de 100,0%; o butilparabeno de pureza 99,9%; o isopropilparabeno de pureza 99,8%; o isobutilparabeno de pureza 99,9%, todos fornecidos pela *Sigma- Aldrich*, Portugal.

2.1.3. Condições Cromatográficas

Os compostos determinam-se por UPLC-PDA, de acordo com um método de ensaio desenvolvido para a separação e quantificação de conservantes em produtos de cosmética. Utilizou-se uma coluna XBridge XP Shield RP 18, Waters (50 x 3.0 mm; 2,5

μm ; 400 bar, estável até 1000 bar), acoplada a uma pré-coluna XBridge BEH Shield RP18, 2.5 μm . A temperatura da coluna manteve-se a 35 °C.

As Figura 7 apresenta as fotografias do equipamento de UPLC-PDA utilizado, bem como a coluna cromatográfica e a pré-coluna.



Figura 7. Fotografias do equipamento de UPLC-PDA, bem como a coluna e pré-coluna utilizada, respetivamente.

O sistema cromatográfico utilizou duas fases móveis: a fase móvel A, constituída por 0,01 mol/L de di-hidrogenofosfato de sódio mono-hidratado [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$] a pH 2,7; e a fase móvel B, constituída por metanol/acetonitrilo (90:10, v/v). A separação efetuou-se em modo gradiente, a um fluxo de 1,2 mL/min, conforme indicado na Tabela 1. Definiu-se o volume de injeção de 1 μL , o tempo de corrida de 21 minutos e a deteção realizou-se a dois comprimentos de onda: 214 nm e 254 nm. Nos cromatogramas, o eixo dos x corresponde ao tempo de retenção (t_R , em minutos/min) e o eixo dos y expressa a intensidade do sinal de absorção em unidade arbitrária (AU), tal como registado pelo detetor PDA.

Tabela 1. Programa de gradiente utilizado na separação dos conservantes por UPLC: composição das fases móveis ao longo do tempo.

Tempo	Fluxo	Fase Móvel A	Fase Móvel B
(min)	(mL/min)	(%, v/v)	(%, v/v)
0,00	1,20	83.5	16.5
1.50	1,20	83.5	16.5
9.00	1,20	45.0	55.0
14.0	1,20	28.5	71.5
14.3	1,20	1.00	99.0
17.7	1,20	1.00	99.0
17.9	1,20	83.5	16.5
21.0	1,20	83.5	16.5

2.1.4. Preparação de soluções

2.1.4.1. Fase Móvel A

Procedeu-se à preparação da fase móvel A constituída por tampão $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, a pH 2,7.

Para a preparação de 5,0 L da fase móvel A, pesou-se 5,20 g de NaH_2PO_4 . De seguida, dissolveu-se o NaH_2PO_4 em 4,75 L de água ultrapura sob agitação magnética, ajustando-se o pH com uma solução concentrada de H_3PO_4 até atingir pH 2,7.

Após o ajuste de pH, completou-se o volume a 5,0 L com água ultrapura. Posteriormente, procedeu-se à agitação adicional, seguida de filtração e de tratamento em banho de ultrassons durante 30 minutos, ficando a solução pronta para utilização no sistema UPLC.

2.1.4.2. Fase Móvel B

Procedeu-se à preparação da fase móvel B, a partir da mistura de metanol e ACN, na proporção de 900 mL para 90 mL, respetivamente.

Homogeneizou-se por agitação e submeteu-se a um banho de ultrassons durante 30 minutos, encontrando-se pronta para utilização no sistema UPLC.

2.1.4.3. Soluções de Limpeza

Procedeu-se à preparação das soluções de limpeza, constituídas por 90% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de água ultrapura, o que corresponde a 900 mL de metanol e 100 mL de água ultrapura por litro de solução. Homogeneizou-se a mistura por agitação e submeteu-se a um banho de ultrassons durante 30 minutos, ficando pronta para utilização no sistema UPLC.

Submeteram-se todas as fases móveis e soluções de limpeza, incluindo a água ultrapura, a um banho de ultrassons durante 30 minutos, garantindo a remoção de gases dissolvidos e de eventuais impurezas.

Utilizou-se a solução de limpeza para lavar os canais do injetor (*Needle wash*), da agulha (*Sample Wash*) e da bomba (*Seal Wash*).

2.1.4.4. Solução Extração

Procedeu-se à preparação da solução extração, utilizada na preparação das soluções *stock*, soluções padrão e soluções amostra, bem como do branco, utilizado como controlo das soluções no UPLC.

A solução consistiu na diluição de H_3PO_4 concentrado em metanol, na proporção de 10 mL de H_3PO_4 e 990 mL de metanol. Posteriormente, agitou-se durante 20–30 minutos e transferiu-se a solução para um frasco *Schott*.

Nota: não se recorreu a um banho de ultrassons nesta solução, por não ser introduzida diretamente no sistema UPLC, sendo utilizada apenas na forma diluída na preparação das soluções a determinar.

2.1.4.5. Soluções *stock* de referência

A preparação das soluções *stock* de referência constituiu um passo fundamental para a validação do método de ensaio e para a posterior análise e quantificação das amostras de *aftershaves*.

Prepararam-se as soluções *stock* com uma massa aproximada de 50,00 mg de cada conservante, utilizando balões de 5,000 mL e 10,00 mL, perfazendo-se sempre o

volume com a solução extração. As massas efetivamente pesadas encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Massas pesadas e respetivos balões volumétricos necessários para a preparação das soluções stock dos conservantes.

Conservantes	Massa (mg)	Balão Volumétrico (mL)
Fenoxietanol	50,83	10,00
Benzoato de Sódio	59,33	10,00
Ácido Sórbico	50,14	10,00
Clorhexidina	51,96	10,00
Clorfenesina	25,04	5,000
Metilparabeno	50,02	10,00
Etilparabeno	50,23	10,00
Propilparabeno	50,00	10,00
Butilparabeno	50,22	10,00
Isopropilparabeno	23,97	5,000
Isopropilbutilparabeno	25,15	5,000

No caso do ácido benzóico, disponível apenas na forma de sal (benzoato de sódio), ajustou-se a massa pesada em função da diferença de massa molar. Relativamente à clorfenesina, ao isopropilparabeno e ao isobutilparabeno, dada a reduzida disponibilidade do padrão, procedeu-se a um ajuste das massas pesadas e das respetivas diluições, de modo a minimizar o consumo destes compostos.

2.1.4.6. Soluções Padrão

Prepararam-se oito soluções padrão para a calibração (P1 a P8). Cada solução constituiu-se por uma mistura dos conservantes selecionados (fenoxietanol, ácido benzóico, ácido sórbico, clorfenesina, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno e isobutilparabeno).

No caso da clorhexidina, devido à sua instabilidade em solução, prepararam-se as respetivas soluções *stock* no próprio dia da análise, com dissolução prévia em pequena quantidade de metanol e posterior adição da solução extração, minimizando a degradação. Para este composto, elaborou-se uma curva de calibração específica e independente.

Para o butilparabeno, prepararam-se as soluções *stock* e a curva de calibração independente, devido a uma contaminação detetada no branco.

Assim, para a clorhexidina e para o butilparabeno, prepararam-se igualmente oito soluções padrão (P1 a P8), cada uma contendo unicamente o respetivo conservante.

Para todas as curvas de calibração, utilizaram-se as soluções *stock* dos conservantes correspondentes, perfazendo-se o volume com a solução extração (2.1.5.4). As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam a preparação das soluções padrão para os conservantes, para a clorhexidina e para o butilparabeno, respetivamente.

Tabela 3. Preparação das soluções padrão para os conservantes, exceto clorhexidina e butilparabeno.

Solução de Calibração	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1
Volume	1 mL de cada solução stock de referência	1 mL de cada solução stock de referência	4 mL de solução de P8	3 mL de solução de P8	2 mL de solução de P8	1 mL de solução de P8	0,5 mL de solução de P8	1 mL de solução de P3
Balão volumétrico (mL)	50,00	100,0	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Concentração [$\mu\text{g/mL}$]	100,0	50,00	40,00	30,00	20,00	10,00	5,000	1,000

Tabela 4. Preparação das soluções padrão para a clorhexidina.

Solução de Calibração	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1
Volume	1 mL de cada solução stock de referência de clorhexidina	1 mL de cada solução stock de referência de clorhexidina	4 mL de solução de P8	3 mL de solução de P8	2 mL de solução de P8	1 mL de solução de P8	0,5 mL de solução de P8	1 mL de solução de P3
Balão volumétrico (mL)	50,00	100,0	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Concentração [$\mu\text{g/mL}$]	100,0	50,00	40,00	30,00	20,00	10,00	5,000	1,000

Tabela 5. Preparação das soluções padrão para o butilparabeno.

Solução de Calibração	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1
Volume	1 mL de cada solução stock de referência de butilparabeno	1 mL de cada solução stock de referência de butilparabeno	4 mL de solução de P8	3 mL de solução de P8	2 mL de solução de P8	1 mL de solução de P8	0,5 mL de solução de P8	1 mL de solução de P3
Balão volumétrico (mL)	50,00	100,0	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Concentração [$\mu\text{g/mL}$]	100,0	50,00	40,00	30,00	20,00	10,00	5,000	1,000

A identificação dos conservantes associados aos picos cromatográficos realizou-se através de ensaios cromatográficos de soluções individuais obtidas pela diluição das soluções *stock*, de modo a obter uma concentração igual à da solução P7.

2.1.4.7. Padrões de Controlo

As soluções *stock* dos conservantes prepararam-se em duplicado: uma destinada à elaboração da curva de calibração (linearidade) e outra à constituição dos padrões de controlo (repetibilidade e exatidão), assegurando robustez analítica e resultados fiáveis e precisos.

Prepararam-se dois padrões de controlo: P7, idêntico ao da curva de calibração, mas obtido a partir de uma solução *stock* independente (designada solução *stock* 2), e P4, também correspondente às concentrações indicadas nas tabelas apresentadas anteriormente. De acordo com o método utilizado, o padrão P4 apenas seria injetado a cada dez injeções, funcionando como controlo interno da solução, isto é, para monitorizar eventuais alterações no sinal e/ou no t_R .

Recorreu-se à utilização de dois padrões de controlo para abranger diferentes intervalos de concentração. O padrão P4 aplicou-se quando os analitos se encontravam em gamas de concentração muito baixas, nomeadamente quando próximas ou abaixo do LOQ (P1/P2), enquanto o padrão P7 se utilizou para soluções amostras com níveis de concentração mais elevados, conforme especificado no método.

Apesar de o método especificar a injeção do padrão P4 apenas a cada dez injeções, optou-se por incluí-lo também como padrão inicial, em conjunto com o P7.

2.1.5. Preparação de Amostras

Por fim, procedeu-se à preparação das amostras: pesaram-se 500,00 mg, para um balão volumétrico de 25,00 mL. Adicionaram-se 15 mL de solução extração, agitando-se manualmente e em *vórtex*, seguindo-se um banho de ultrassons durante 15 minutos. Recorreu-se à placa de agitação durante 30-60 minutos, consoante o grau de “dissolução” da matriz.

Procedeu-se ao repouso das soluções até atingirem a temperatura ambiente e, após esse período, completou-se o volume com a solução extração. Quando necessário, diluiu-se a solução amostra, dado que, em alguns casos, a área do pico do conservante excedeu a área do pico para a solução padrão de maior concentração.

Seguidamente, efetuou-se a filtração das soluções amostras (ou das respetivas diluições), através de filtros PTFE 0,45 μm , utilizando-se uma seringa de 5 mL. A

dificuldade no processo de filtração dependeu da viscosidade e do estado físico da amostra. Assim, filtrou-se diretamente para o *vial*, ficando prontas para injeção no sistema UPLC.

Importa salientar que as amostras devem manter-se o mais homogêneas possível; contudo, em determinadas matrizes, não se conseguiu eliminar integralmente grumos, névoas ou fragmentos sólidos. Por exemplo, produtos cosméticos mais espessos (como cremes, *champôs* ou bálsamos) tendem a exigir maior esforço na preparação e no manuseamento, ao passo que matrizes líquidas (como perfumes) são, em geral, de processamento mais simples. Neste trabalho, as análises incidiram sobre amostras de *aftershaves*, apresentadas sob a forma líquida e sob a forma de bálsamos, sendo nestes últimos necessária a utilização de uma placa de agitação.

Adicionalmente, em situações em que surgiram dúvidas na identificação de determinados conservantes, procedeu-se à fortificação das soluções amostra. Este procedimento consistiu na adição de 800 µL da solução amostra a 200 µL do padrão correspondente, com duas injeções consecutivas, aumentando o sinal do conservante presente. Desta forma, a sobreposição dos picos cromatográficos entre a solução amostra e o padrão de controlo possibilitou a confirmação da identidade do analito em questão.

Para a identificação dos picos cromatográficos (*screening*) utilizou-se um único replicado por amostra. Já para o doseamento dos conservantes identificados, recorreu-se a três replicados independentes por amostra, assegurando a reprodutibilidade e fiabilidade dos resultados obtidos.

3. Resultados e Discussão

Na presente secção apresentam-se os resultados do trabalho experimental, organizados em duas vertentes principais: a validação do método analítico desenvolvido e a sua aplicação à análise e doseamento de amostras de *aftershaves*. A discussão dos dados visa avaliar a fiabilidade do método e a relevância dos resultados obtidos.

3.1. Validação do método

A validação do método analítico constituiu um passo fulcral para a análise e doseamento das amostras de *aftershaves*, assegurando a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Este processo contemplou a avaliação de parâmetros fundamentais – linearidade, a repetibilidade, a exatidão e o LOD e LOQ – de forma a garantir a qualidade e a consistência do método.

Os critérios avaliados comprovaram a adequação do procedimento para a determinação de conservantes em produtos cosméticos por UPLC-PDA, em conformidade com as normas internas do INFARMED e com os requisitos do Regulamento (CE) n.º 1223/2009, bem como de acordo com os princípios definidos na ISO/IEC 17025:2017, na ICH Q2 (R1) e no guia RELACRE 13 (2011).

Importa salientar que apenas após o processamento das curvas de calibração é possível proceder à análise dos restantes parâmetros de validação e dos brancos, de modo a identificar eventuais interferentes ou contaminações.

3.1.1. Identificação dos picos cromatográficos

A identificação dos picos cromatográficos consistiu numa etapa preliminar indispensável, realizada previamente à avaliação dos parâmetros de validação, permitindo associar cada conservante ao respetivo t_R .

Para tal, injetaram-se individualmente as soluções dos padrões dos conservantes – as soluções diluídas P7 – e, posteriormente, uma solução mistura P7, ambas preparadas a partir das soluções *stock*, o que possibilitou confirmar a separação adequada e atribuir rigorosamente os picos observados aos respetivos analitos.

É de destacar que a solução mistura P7 não incluiu a clorhexidina, devido à sua elevada instabilidade, comprometendo a integridade da solução. No caso do butilparabeno, incluiu-se inicialmente, mas após o processamento dos brancos verificou-se a existência de contaminação, sendo que posteriormente se procedeu a uma validação independente apenas para este analito.

Este procedimento permitiu confirmar os t_R característicos de cada conservante, comparar a sua resposta em diferentes condições cromatográficas e utilizá-los como referência para o processamento dos cromatogramas.

Deste modo, analisaram-se os cromatogramas obtidos pelo detetor PDA em dois comprimentos de onda distintos: 214 nm e 254 nm, verificando-se que determinados analitos apresentaram maior absorção num dos comprimentos de onda. O método estabelece que o fenoxietanol, ácido benzóico, clorfenesina e clorhexidina apresentam maior absorção a 214 nm, ao passo que o ácido sórbico e os parabenos apresentam maior absorção a 254 nm. O primeiro pico corresponde ao pico do solvente – pico 0.

Assim, apresentam-se, de seguida, os cromatogramas de identificação dos conservantes, registados no comprimento de onda mais representativo de cada composto: 214 nm para o fenoxietanol, ácido benzóico, clorfenesina e clorhexidina; e 254 nm para os restantes conservantes.

Para a clorhexidina apenas se efetuou a identificação do pico a 214nm, uma vez que a 254 nm não se observou qualquer sinal. Nos restantes conservantes, embora apresentassem menor absorção nesse comprimento, ainda se observou uma resposta detetável.

3.1.1.1. Identificação dos picos a 214nm

As Figuras 8 a 11 apresentam-se os cromatogramas correspondentes à identificação dos conservantes com maior absorção a 214nm.

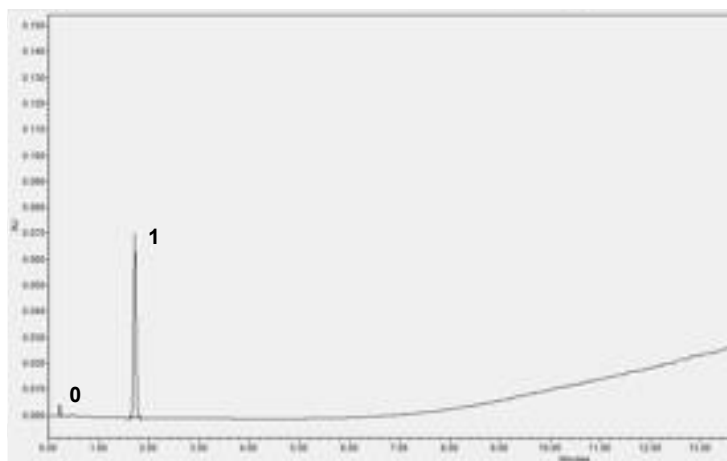


Figura 8. Pico cromatográfico de identificação do Fenoxietanol, obtido a 214 nm, com um t_R de 1,715 minutos.

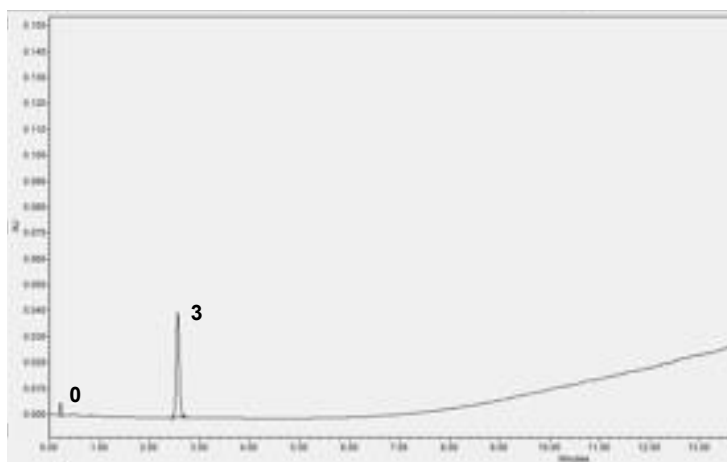


Figura 9. Pico cromatográfico de identificação do Ácido Benzóico, obtido a 214 nm, com um t_R de 2,562 minutos.

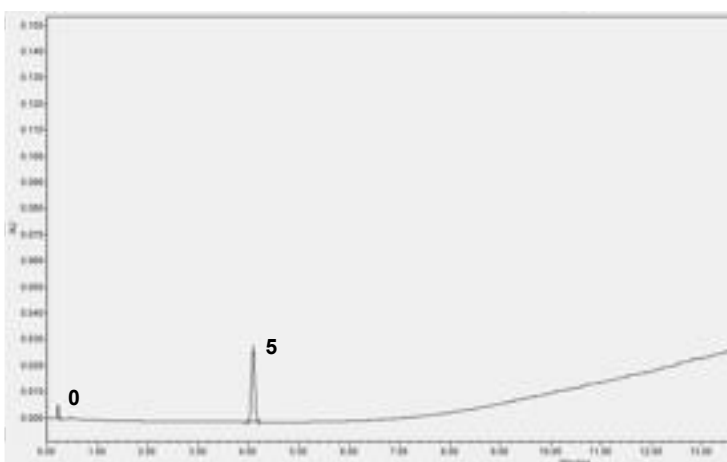


Figura 10. Pico cromatográfico de identificação do Clorfenesina, obtido a 214 nm, com um t_R de 4,091 minutos.

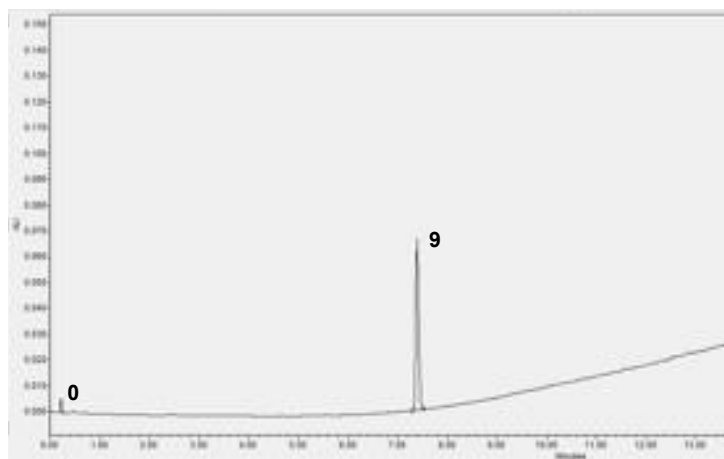


Figura 11. Pico cromatográfico de identificação do Clorhexidina, obtido a 214 nm, com um t_R de 7,392 minutos.

3.1.1.2. Identificação dos picos a 254nm

As Figuras 12 a 18 apresentam-se os cromatogramas correspondentes à identificação dos conservantes com maior absorção a 254nm.

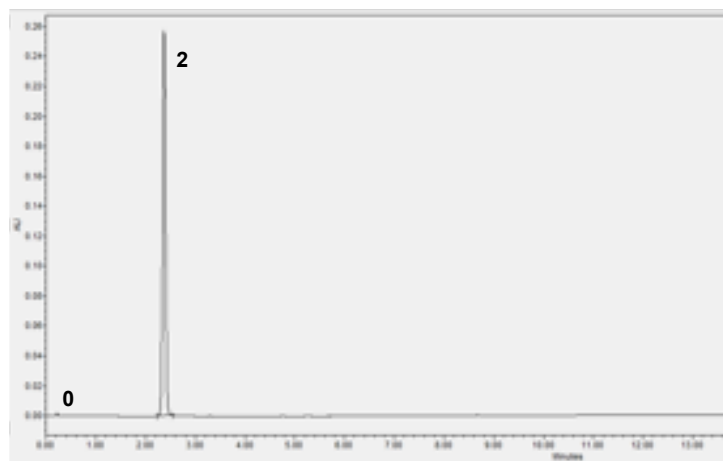


Figura 12. Pico cromatográfico de identificação do Ácido Sórbico, obtido a 254 nm, com um t_R de 2,369 minutos.

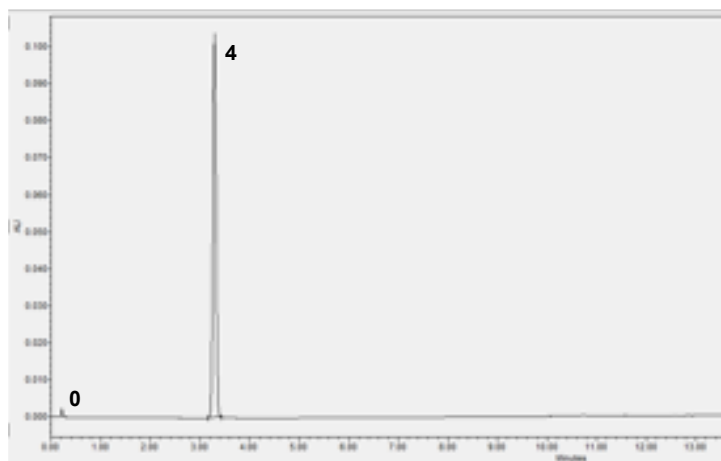


Figura 13. Pico cromatográfico de identificação do Metilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 3,292 minutos.

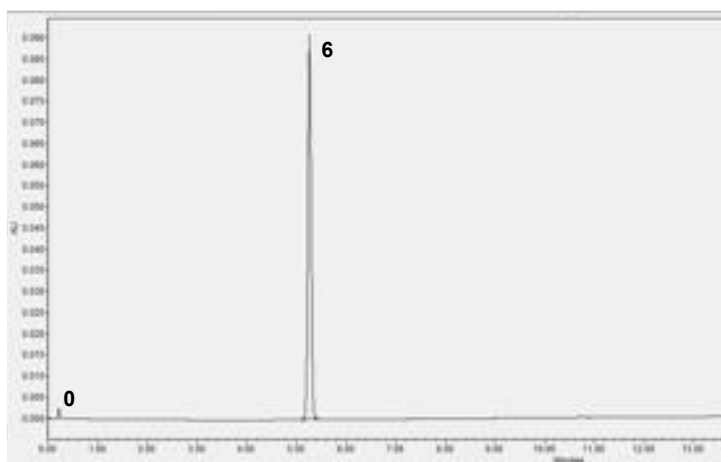


Figura 14. Pico cromatográfico de identificação do Etilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 5,261 minutos.

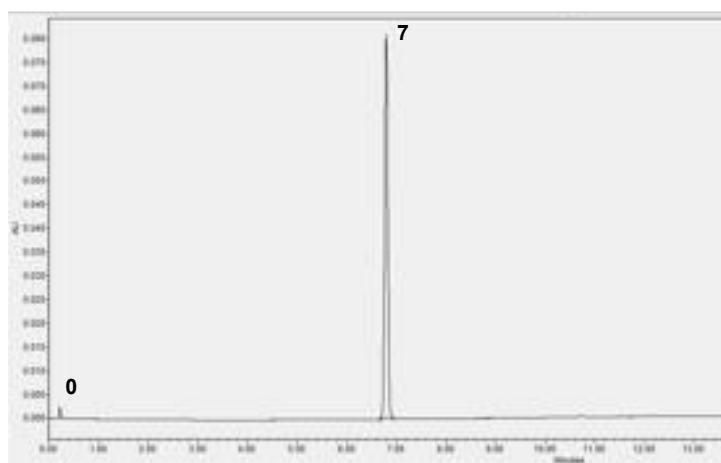


Figura 15. Pico cromatográfico de identificação do Isopropilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 6,795 minutos.

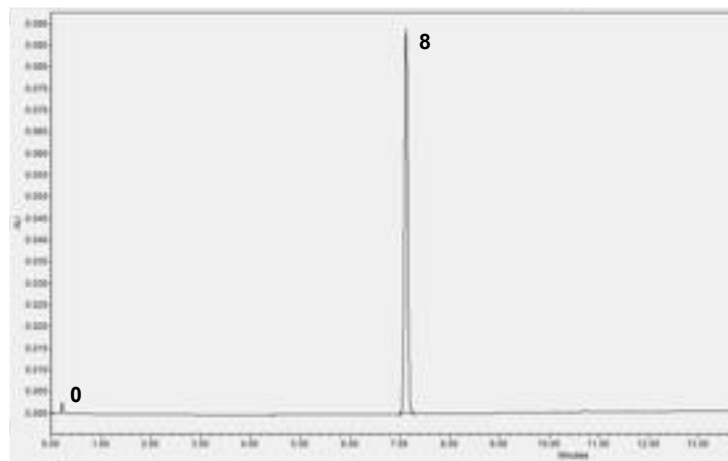


Figura 16. Pico cromatográfico de identificação do Propilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 7,126 minutos.

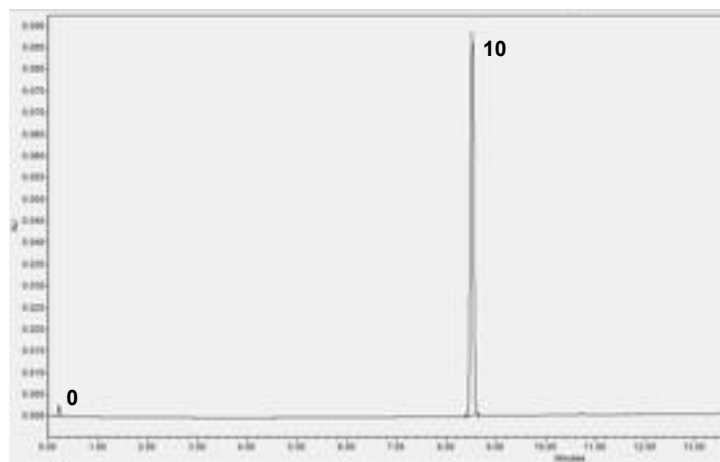


Figura 17. Pico cromatográfico de identificação do Isobutilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 8,519 minutos.

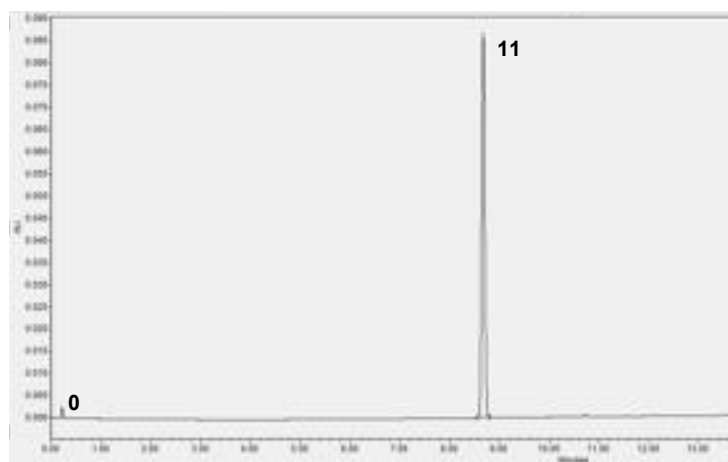


Figura 18. Pico cromatográfico de identificação do Butilparabeno, obtido a 254 nm, com um t_R de 8,675 minutos.

3.1.1.3. Identificação dos picos na solução mistura P7

Após a análise individual dos conservantes, procedeu-se à avaliação da solução mistura, de modo a confirmar a atribuição de cada conservante ao respetivo pico cromatográfico. Com base nos t_R obtidos individualmente, ajustaram-se os respetivos valores na solução mistura, evitando sobreposições de picos e potenciais erros de identificação decorrentes da aglomeração dos mesmos. Desta forma, identificaram-se todos os conservantes em simultâneo, com exceção da clorhexidina.

As Figuras 19 e 20 apresentam os cromatogramas correspondentes à solução mistura P7, obtidos a 214 nm e 254 nm, respetivamente.

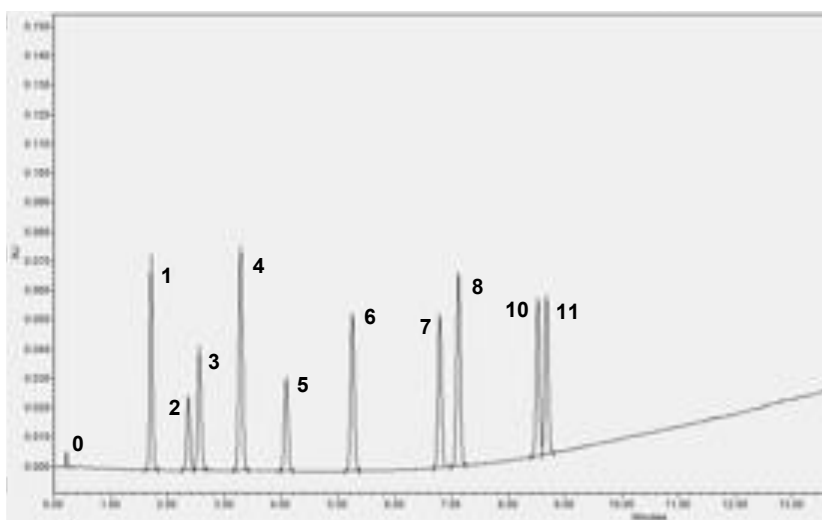


Figura 19. Cromatograma de identificação da solução mistura P7, contendo todos os conservantes, com exceção da clorhexidina, obtido a 214 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.

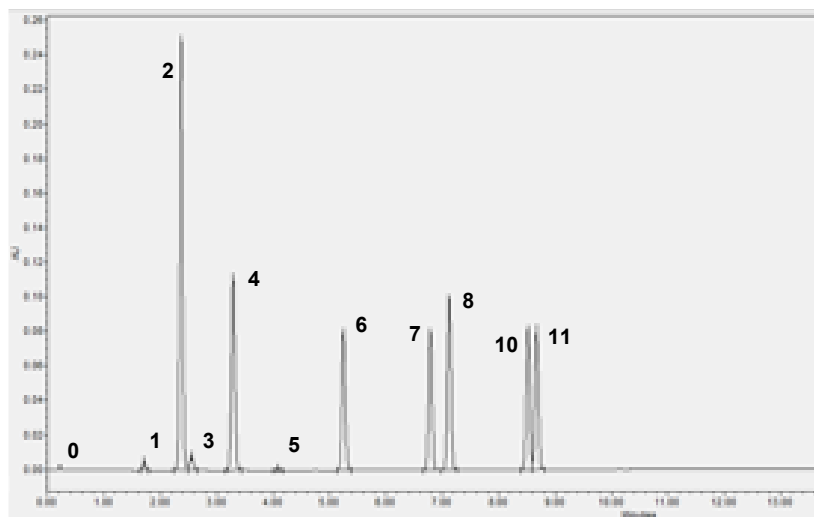


Figura 20. Cromatograma de identificação da solução mistura P7, contendo todos os conservantes, com exceção da clorhexidina, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.

Na solução mistura P7, a ordem de eluição dos conservantes verificou-se de acordo com o método descrito, correspondendo sucessivamente a fenoxietanol, ácido sórbico, ácido benzóico, metilparabeno, clorfenesina, etilparabeno, isopropilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno e butilparabeno. A clorhexidina não se incluiu nesta solução, devido à sua instabilidade, mas o respetivo t_R determinou-se previamente nas injeções individuais, permitindo posicioná-la corretamente na sequência. O pico 0 corresponde ao solvente, que apresentou maior absorção a 214 nm, conforme observado nas Figuras 19 e 20.

Na Tabela 6 apresentam-se os t_R registados para cada conservante na solução mistura P7, em comparação com os obtidos nas injeções individuais. Os t_R mantiveram-se consistentes entre as duas soluções e nos dois comprimentos de onda.

Tabela 6. T_R dos conservantes na mistura P7, em comparação com as injeções individuais, em ambos os comprimentos de onda (214 e 254 nm).

Conservante	t_R (minutos)	
	S. Individual	S. Mistura P7
Fenoxietanol	1,715	1,702
Ácido Sórbico	2,369	2,356
Ácido Benzoico	2,562	2,547
Metilparabeno	3,292	3,276
Clorfenesina	4,091	4,077
Etilparabeno	5,261	5,241
Isopropilparabeno	6,795	6,779
Propilparabeno	7,126	7,110
Clorhexidina	7,392	—
Isobutilparabeno	8,519	8,506
Butilparabeno	8,675	8,661

As variações observadas nos t_R relativamente às injeções individuais apresentaram-se pouco significativas, encontrando-se dentro do expectável. Estas diferenças justificam-se pelas interações entre os conservantes quando determinados em simultâneo, podendo desencadear ligeiros atrasos ou antecipações na ordem de retenção. A utilização da solução mistura revelou-se, por isso, essencial para confirmar a ordem de eluição e assegurar uma identificação inequívoca, sobretudo em situações de proximidade de picos, como nos pares ácido benzoico/ácido sórbico, isopropilparabeno/propilparabeno e isobutilparabeno/butilparabeno.

3.1.2. Linearidade

A linearidade avaliou-se através da construção de curvas de calibração, obtidas a partir de oito soluções padrão (P1 a P8), abrangendo concentrações entre 1,000 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$, em dois comprimentos de onda: 214 nm e 254 nm, quer para os conservantes, quer para a clorhexidina e para o butilparabeno. Utilizaram-se as curvas a 214 nm para o fenoxietanol, o ácido benzoico, clorfenesina e clorhexidina, enquanto as curvas de 254 nm se aplicaram ao ácido sórbico e parabenos. Para cada composto considerou-se o comprimento de onda com maior absorvância, assegurando assim a sensibilidade do método.

Através do método dos mínimos quadrados, elaboraram-se as curvas de calibração, considerando apenas duas injeções por padrão, ainda que o P1 e o P2 tenham sido injetados seis vezes, em conformidade com os critérios definidos para o LOD e LOQ. Além disso, aplicou-se o critério definido para os valores residuais, considerando-se aceitáveis até $\pm 10\%$ e excluindo-se os pontos que não cumpriram esta condição, em conformidade com o método de ensaio. Especificamente, admitiram-se $|\text{residuais}| \leq 10\%$ [Linearidade sem LOQ] e $|\text{residuais}| \leq 20\%$ [Linearidade com LOQ].

Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos para os diferentes conservantes situaram-se consistentemente em 0,9999, cumprindo o critério mínimo de aceitação ($R^2 \geq 0,990$), em conformidade com as recomendações da ICH Q2 (R1) e do guia RELACRE 13 (2011).

As curvas de calibração de cada conservante (Figuras 21 a 31) evidenciam linearidade adequada na gama estudada, assegurando o correta doseamento dos compostos.

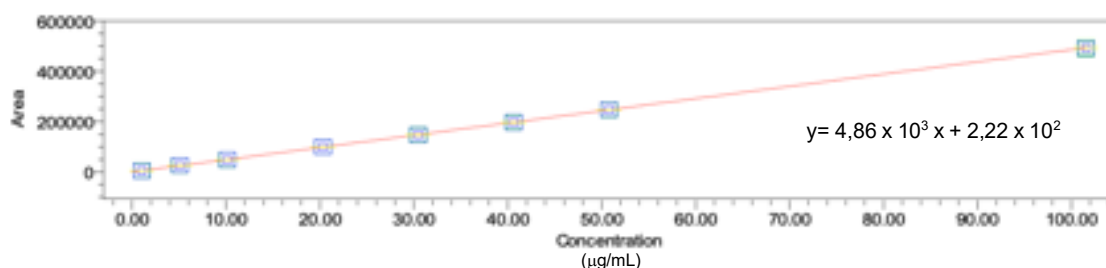


Figura 21. Curva de calibração do Fenoxietanol, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

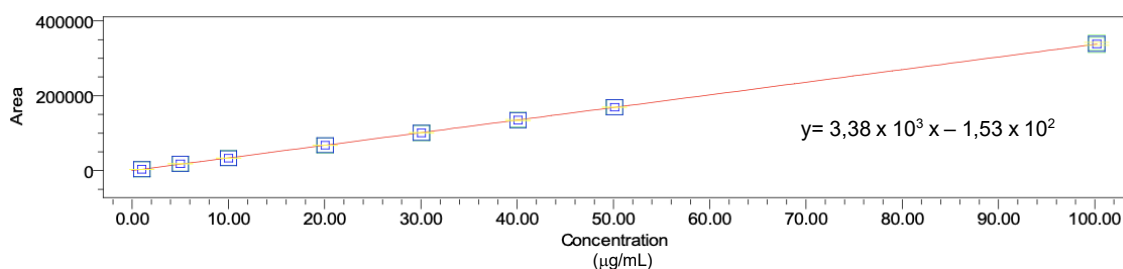


Figura 22. Curva de calibração do Ácido Benzóico, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

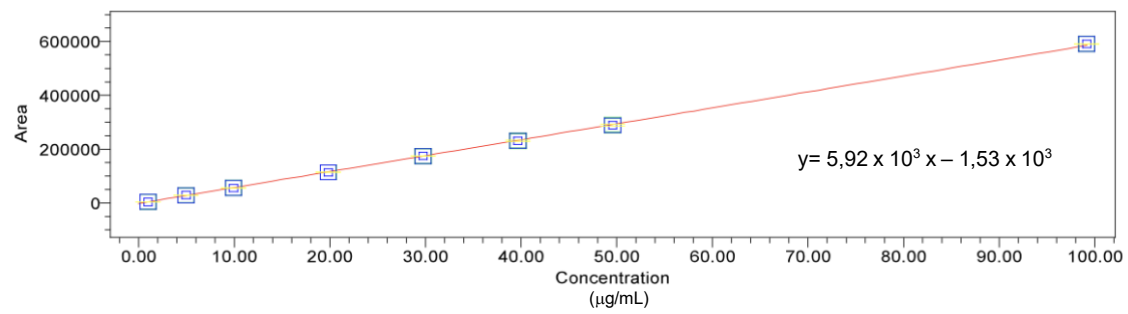


Figura 23. Curva de calibração da Clorhexidina, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

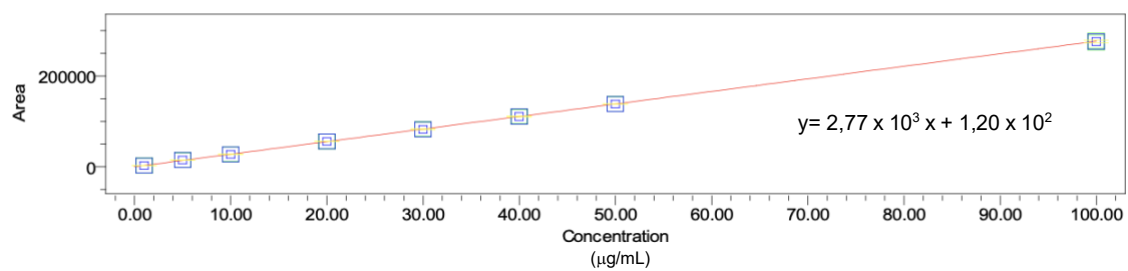


Figura 24. Curva de calibração da Clorfenesina, obtida a 214nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

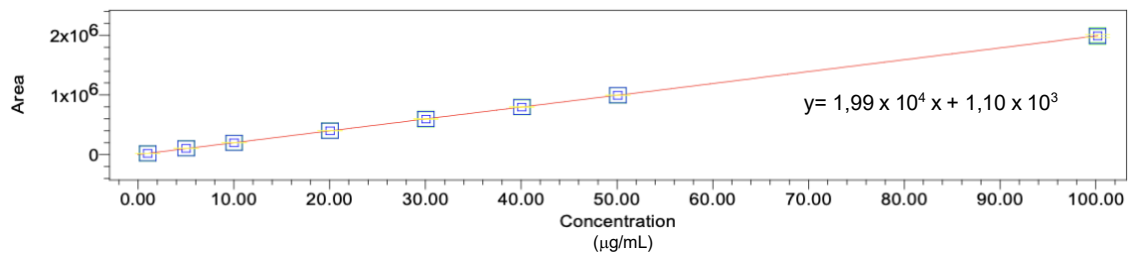


Figura 25. Curva de calibração do Ácido Sórbico, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

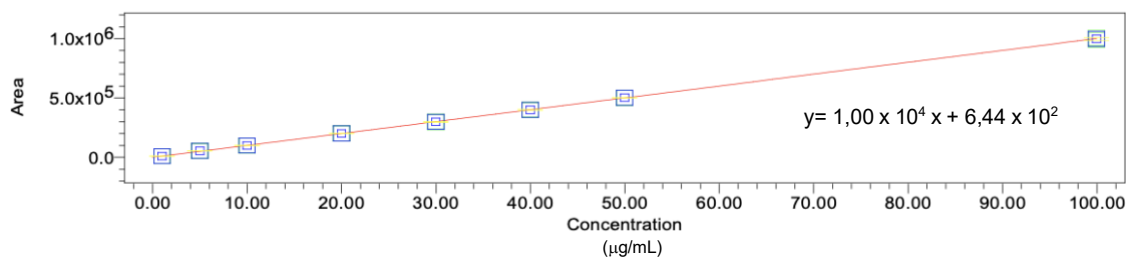


Figura 26. Curva de calibração do Metilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

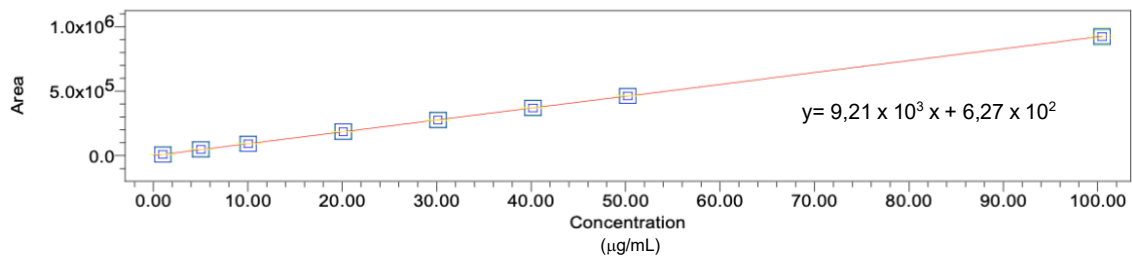


Figura 27. Curva de calibração do Etilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

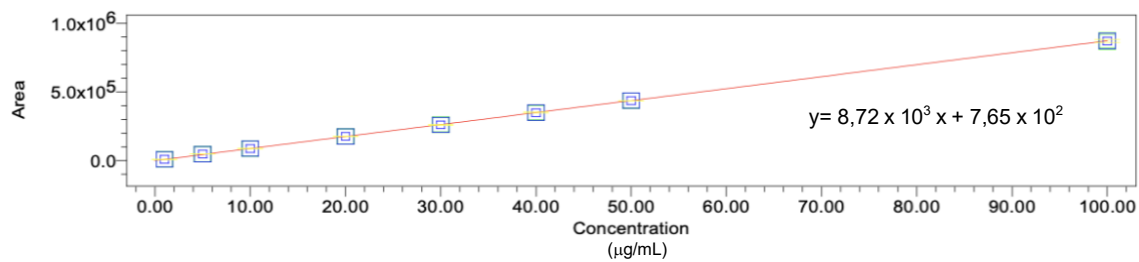


Figura 28. Curva de calibração do Propilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

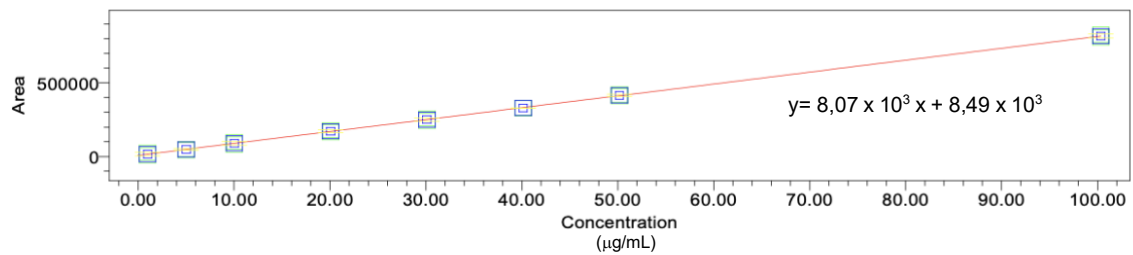


Figura 29. Curva de calibração do Butilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

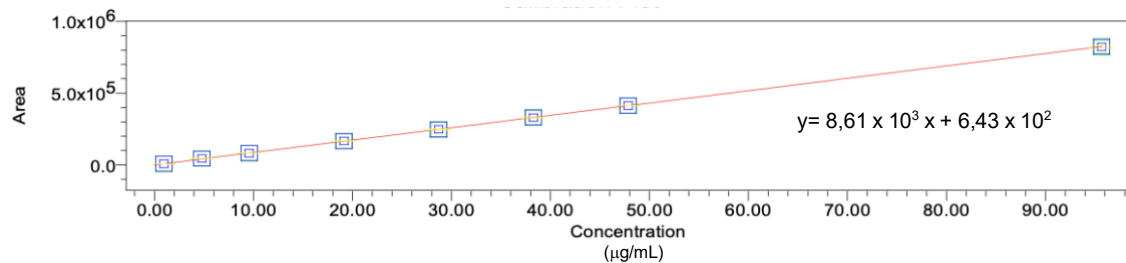


Figura 30. Curva de calibração do Isopropilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R^2 de 0,9999.

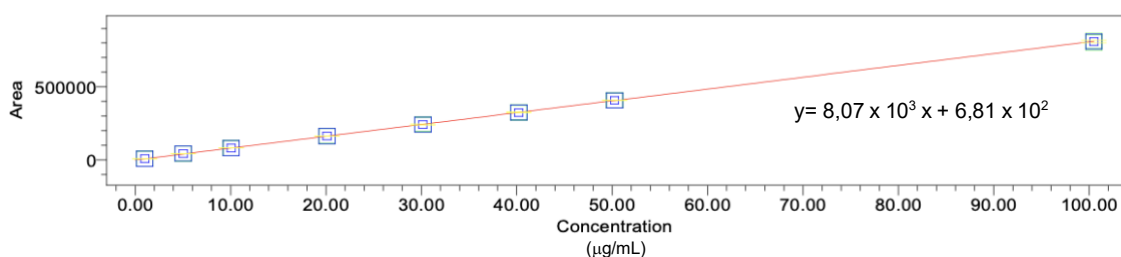


Figura 31. Curva de calibração do Isobutilparabeno, obtida a 254nm, apresentando um R² de 0,9999.

De forma complementar às figuras anteriormente apresentadas, a Tabela 7 sintetiza as equações da reta e os R², corroborando a adequabilidade do método analítico para todos os conservantes.

Tabela 7. Resumo das retas de calibração e dos respectivos R² obtidos para cada conservante, nos comprimentos de onda indicados.

Conservantes	Equação da Reta	R ²	Comprimento de onda - λ (nm)
Fenoxietanol	y= 4,86 x 10 ³ x + 2,22 x 10 ²	0,9999	214
Ácido Benzóico	y= 3,38 x 10 ³ x – 1,53 x 10 ²	0,9999	214
Clorfenesina	y= 2,77 x 10 ³ x + 1,20 x 10 ²	0,9999	214
Clorhexidina	y= 5,92 x 10 ³ x – 1,53 x 10 ³	0,9999	214
Ácido Sórbico	y= 1,99 x 10 ⁴ x + 1,10 x 10 ³	0,9999	254
Metilparabeno	y= 1,00 x 10 ⁴ x + 6,44 x 10 ²	0,9999	254
Etilparabeno	y= 9,21 x 10 ³ x + 6,27 x 10 ²	0,9999	254
Isopropilparabeno	y= 8,61 x 10 ³ x + 6,43 x 10 ²	0,9999	254
Propilparabeno	y= 8,72 x 10 ³ x + 7,65 x 10 ²	0,9999	254
Isobutilparabeno	y= 8,07 x 10 ³ x + 6,81 x 10 ²	0,9999	254
Butilparabeno	y= 8,07 x 10 ³ x + 8,49 x 10 ³	0,9999	254

3.1.3. Brancos

A avaliação dos brancos efetuou-se após o processamento das curvas de calibração, com o objetivo de detetar eventuais interferências, contaminações ou fenómenos de *carryover* no sistema. Este último consiste no arrastamento de resíduos de uma injeção anterior para a subsequente, podendo originar picos nos cromatogramas de brancos e, conseqüentemente, comprometer a fiabilidade dos resultados.

Com o intuito de minimizar estes riscos, injetou-se um branco no início da sequência; antes dos primeiros padrões, para determinar a relação sinal/ruído; no final da

sequência; e ainda entre cada parâmetro de avaliação e cada amostra. Definiu-se como critério de aceitação que a $\text{Resposta}_{\text{Branco}} \leq \text{Resposta}_{\text{LOD}}$, de acordo com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P.

Os brancos injetados em condições idênticas às dos padrões e amostras não apresentaram picos nos t_R característicos dos conservantes doseados. Estes resultados confirmaram a ausência de contaminações ou interferências relevantes, permitindo avançar para a avaliação dos seguintes parâmetros de validação do método, no caso da clorhexidina e dos restantes nove conservantes.

Contudo, para o butilparabeno, verificou-se sistematicamente a presença de um pico no respetivo t_R , ultrapassando o critério de aceitação estabelecido. Este resultado evidenciou uma contaminação associada a este analito, motivo pelo qual se procedeu à sua validação independente, através da elaboração de uma curva de calibração e da preparação dos respetivos padrões de controlo apenas para este analito.

As Figura 32 e 33 apresentam-se os cromatogramas dos brancos obtidos a 214 nm: um sem contaminação e outro onde se observou contaminação do analito – butilparabeno, respetivamente.

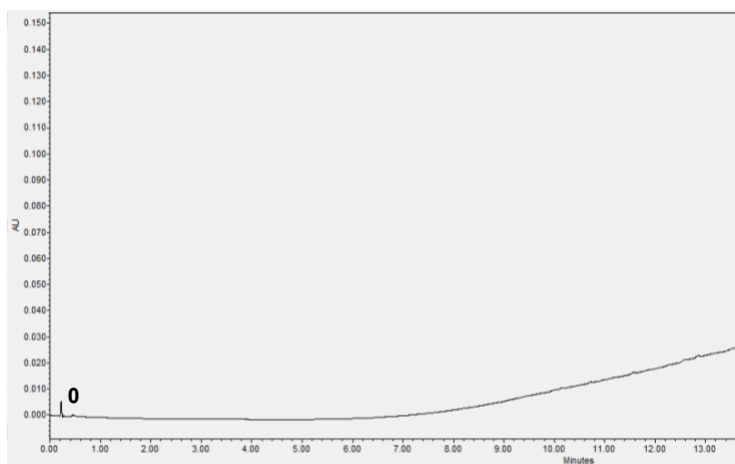


Figura 32. Cromatograma do branco obtido a 214 nm para o conjunto de conservantes.

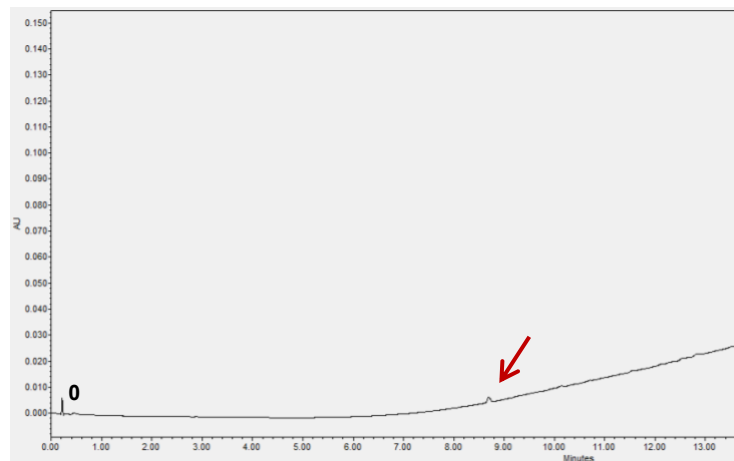


Figura 33. Cromatograma do branco obtido a 214 nm, evidenciando contaminação no analito –butilparabeno.

Na Figura 34 apresenta-se o cromatograma do branco a 254 nm, sem contaminação, apenas um pico interferente, contudo não coincidiu com nenhum dos t_R dos conservantes identificados.

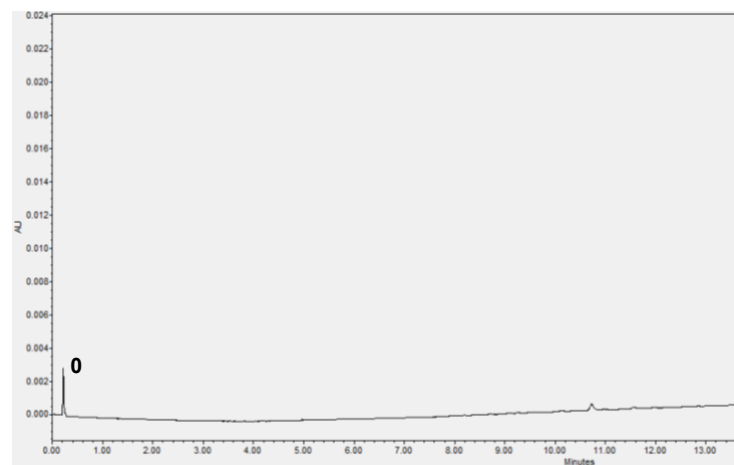


Figura 34. Cromatograma do branco obtido a 254 nm.

Na Figura 35 apresenta-se o cromatograma do branco correspondente à validação independente da clorhexidina, obtido a 214 nm.

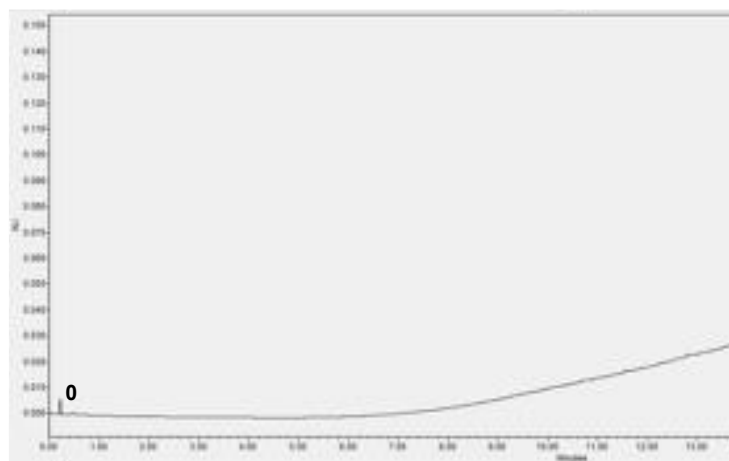


Figura 35. Cromatograma do branco obtido a 214 nm para a clorhexidina.

Na Figura 36 apresenta-se o cromatograma do branco correspondente à validação independente do butilparabeno, obtido a 254 nm. Observou-se um pico por volta dos 11 minutos; contudo, este não coincidiu com nenhum dos t_R dos conservantes identificados, tratando-se apenas de uma interferência do sistema.

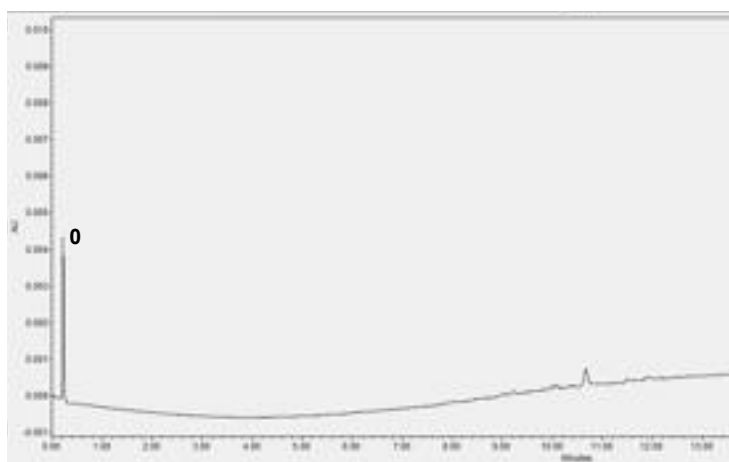


Figura 36. Cromatograma do branco obtido a 254 nm para o butilparabeno.

Assim, constatou-se que a $\text{Resposta}_{\text{Branco}} \leq \text{Resposta}_{\text{LOD}}$, na verificação. Esta etapa permitiu assegurar a robustez dos resultados e constitui um pré-requisito para o processamento dos parâmetros posteriores da validação (repetibilidade, exatidão e limites).

3.1.4. Repetibilidade

Avaliou-se a repetibilidade recorrendo ao P7 e, por opção do INFARMED,I.P., também ao P4; o mesmo critério aplicou-se à clorhexidina e ao butilparabeno. A avaliação realizou-se sob condições constantes – mesmo operador, equipamento e laboratório – de modo a comprovar que os resultados não variam significativamente quando os fatores experimentais permanecem constantes.

De acordo com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED,I.P., a repetibilidade avaliou-se pela injeção consecutiva de seis réplicas dos padrões de controlo, preparadas e injetadas em condições idênticas. Consideraram-se dois níveis de concentração distintos: P4 e P7, correspondentes a gamas baixas e intermédias da curva de calibração.

Para cada conservante calcularam-se os RSD% das áreas dos picos cromatográficos, a fim de avaliar a estabilidade da resposta do equipamento, e dos t_R . Definiu-se como critério de aceitação específico do método de ensaio: $RSD(\text{área}) \leq 5,0\%$; $n = 5$ a 8 injeções e em conformidade com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED,I.P.: $RSD(\text{área}) \leq 5,0\%$; $n = 6$ e $RSD(t_R) \leq 2\%$; $n = 6$.

A repetibilidade avaliou-se com base na análise dos padrões de controlo P4 e P7, preparados de forma independente das soluções utilizadas nas curvas de calibração (solução stock 2). Realizaram-se seis injeções destes padrões a 214 nm e 254 nm, abrangendo os nove conservantes principais, a clorhexidina e o butilparabeno.

Nas Figuras 37 a 44 apresentam-se os cromatogramas organizados por comprimento de onda. Para 214 nm incluem-se os padrões P4, P7 e a clorhexidina; para 254 nm apresentam-se os padrões P4, P7 e o butilparabeno.

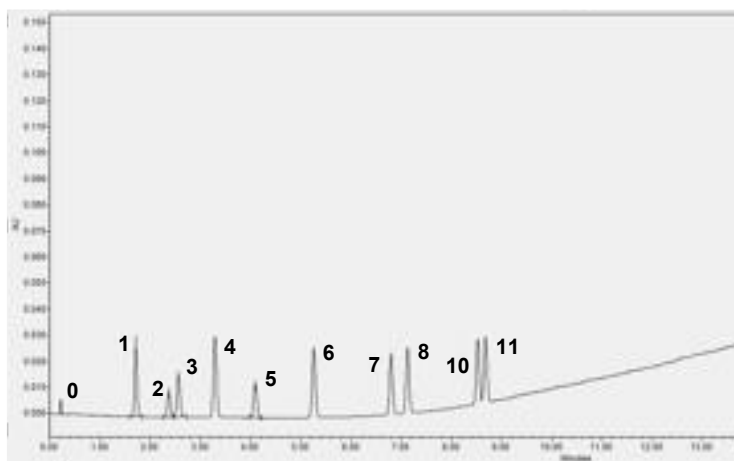


Figura 37. Cromatograma do padrão P4, obtido a 214 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.

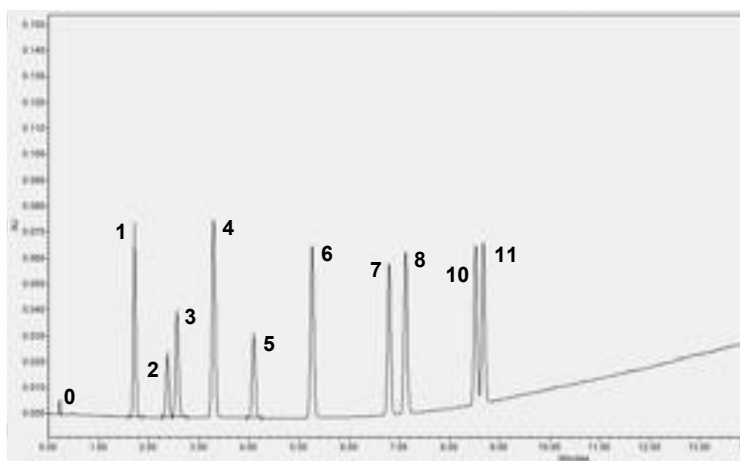


Figura 38. Cromatograma do padrão P7, obtido a 214 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.

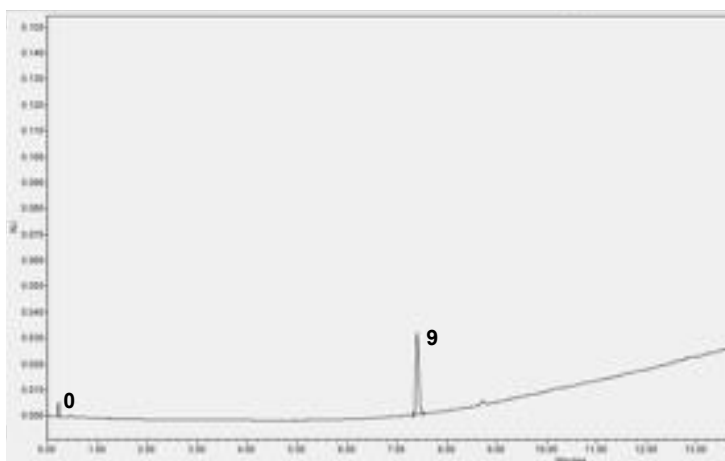


Figura 39. Cromatograma do padrão P4 para a Clorhexidina, obtido a 214 nm.

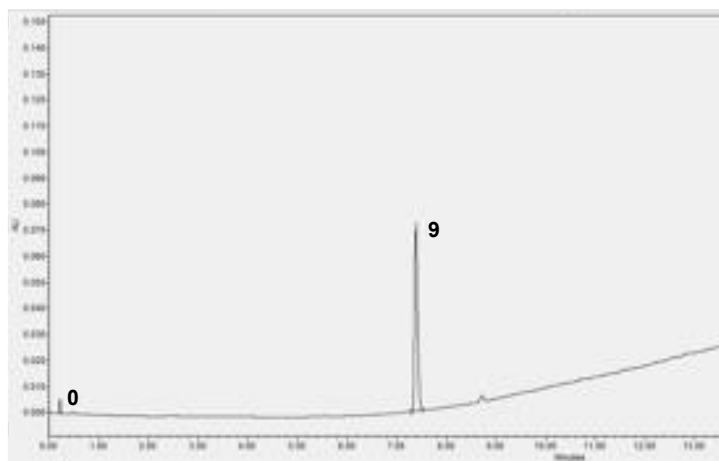


Figura 40. Cromatograma do padrão P7 para a Clorhexidina, obtido a 214 nm.

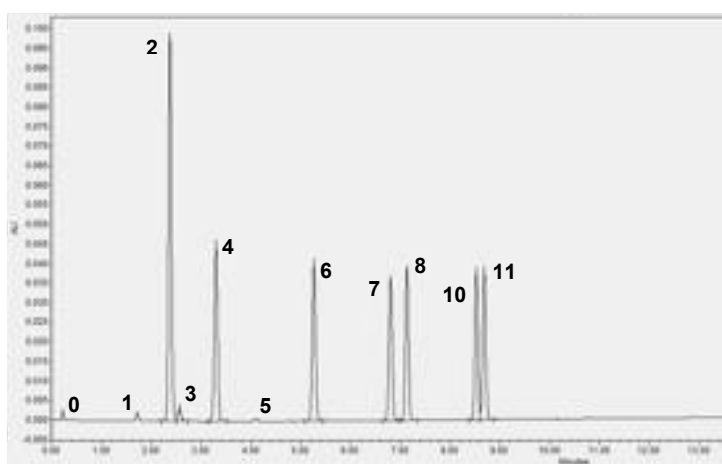


Figura 41. Cromatograma do padrão P4, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.

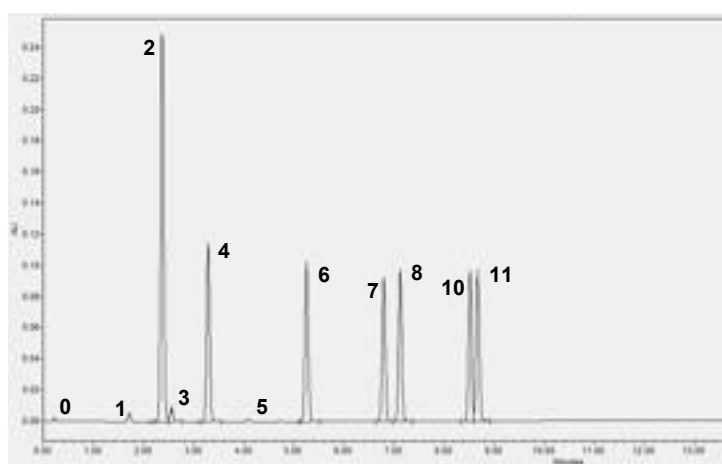


Figura 42. Cromatograma do padrão P7, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 1 - fenoxietanol, 2 - ácido sórbico, 3 - ácido benzóico, 4 - metilparabeno, 5 - clorfenesina, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.

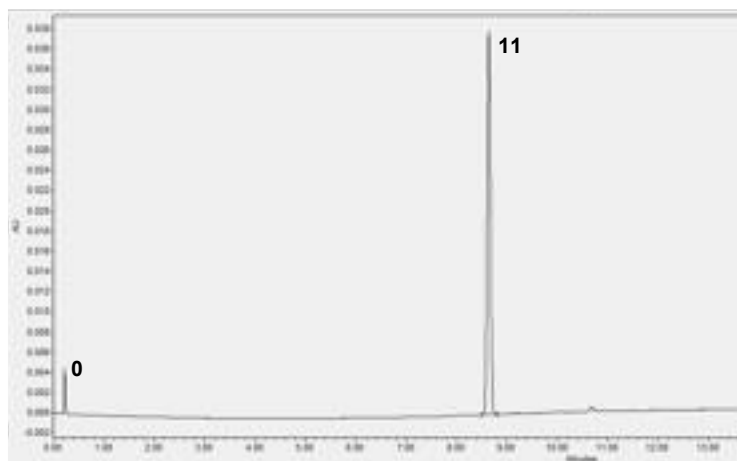


Figura 43. Cromatograma do padrão P4 para o Butilparabeno, obtido a 254 nm.

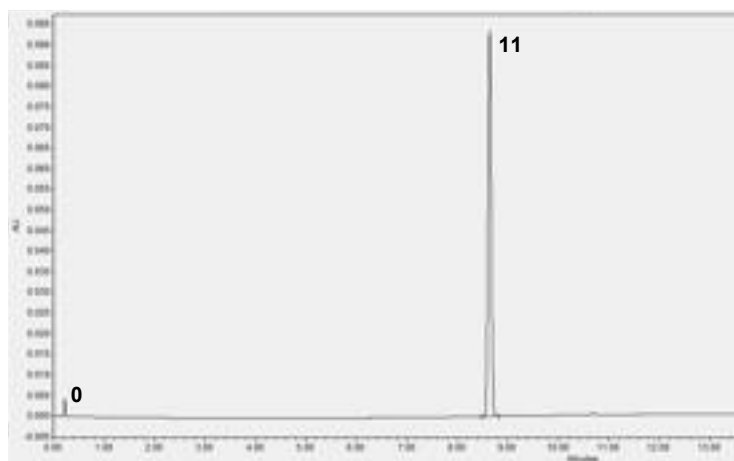


Figura 44. Cromatograma do padrão P7 para o Butilparabeno, obtido a 254 nm.

Posteriormente, na Tabela 8 apresentam-se os valores do RSD% obtidos para as áreas dos picos cromatográficos e para os t_R , para os padrões P4 e P7. Processaram-se os resultados com base no comprimento de onda mais representativo de cada analito: 214 nm para o fenoxietanol, ácido benzóico, clorfenesina e clorhexidina, e 254 nm para o ácido sórbico e os parabenos.

Tabela 8. Valores de RSD% das áreas e dos t_R para os conservantes nos padrões de controlo P4 e P7, obtidos a 214 nm e 254 nm.

Conservantes	Repetibilidade P4		Repetibilidade P7	
	RSD (área) %	RSD (t_R) %	RSD (área) %	RSD (t_R) %
Fenoxietanol	0,7	0,1	0,1	0,1
Ácido Benzoico	0,8	0,1	0,1	0,1
Clorfenesina	0,7	0,1	0,0	0,0
Clorhexidina	0,2	0,0	0,1	0,0
Ácido Sórbico	0,7	0,1	0,1	0,1
Metilparabeno	0,7	0,1	0,1	0,1
Etilparabeno	0,7	0,1	0,0	0,0
Isopropilparabeno	0,7	0,1	0,0	0,0
Propilparabeno	0,7	0,1	0,1	0,0
Isobutilparabeno	0,7	0,0	0,1	0,0
Butilparabeno	0,2	0,1	0,8	0,0

Os resultados obtidos demonstraram que todos os conservantes apresentaram RSD% inferiores aos limites estabelecidos, cumprindo o critério de aceitação: $RSD(\text{área}) \leq 5,0\%$; $n = 6$ e $RSD(t_R) \leq 2\%$; $n = 6$.

Assim, a repetibilidade do método comprovou-se para todos os analitos em estudo, confirmando a precisão e a robustez do procedimento, bem como a consistência da resposta analítica em diferentes níveis de concentração.

3.1.5. Exatidão

Avaliou-se a exatidão com o padrão de controlo P7 e, por opção do INFARMED, I.P., também com o P4; o mesmo critério aplicou-se à clorhexidina e ao butilparabeno. A avaliação realizou-se sob condições constantes idênticas às da repetibilidade.

De acordo com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P., a exatidão avaliou-se pela injeção de duas réplicas dos padrões de controlo, preparadas e injetadas em condições semelhantes. Consideraram-se dois níveis de concentração distintos: P4 e P7, correspondentes a gamas baixas e intermédias da curva de calibração.

Para cada conservante calculou-se o erro associado ao teor estimado. Definiu-se como critério de aceitação específico do método de ensaio, em conformidade com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P.: $|\text{Erro}|$ associado ao

teor estimado $\leq 10\%$. Ou seja, os valores de recuperação (%) deveriam situar-se entre 90 e 110%, de acordo com as Equações 3 e 4.

$$\text{Teor de padrão (\%)} = \frac{\text{Concentração} \times \text{Diluição padrão}}{\text{Massa padrão} \times \text{Pureza Padrão}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Erro (\%)} = |100\% - \text{Teor de padrão (\%)}| \quad (4)$$

A exatidão avaliou-se com base na análise dos padrões de controlo P4 e P7, preparados de forma independente das soluções utilizadas nas curvas de calibração (solução stock 2). Realizaram-se duas injeções destes padrões a 214 nm e 254 nm, abrangendo os nove conservantes principais, a clorhexidina e o butilparabeno.

Os cromatogramas obtidos foram idênticos aos da repetibilidade, uma vez que se recorreu aos mesmos padrões P4, P7 para 214 nm e 254 nm, clorhexidina a 214 nm e butilparabeno a 254 nm.

Na Tabela 9 apresentam-se os valores da recuperação (%) obtidos para cada conservante nos padrões P4 e P7. Processaram-se os resultados com base no comprimento de onda mais representativo de cada analito: 214 nm para o fenoxietanol, ácido benzóico, clorfenesina e clorhexidina, e 254 nm para o ácido sórbico e os parabenos.

Tabela 9. Valores de Recuperação (%) dos conservantes nos padrões de controlo P4 e P7, obtidos a 214 nm e 254 nm.

Conservantes	Recuperação %	
	Exatidão P4	Exatidão P7
Fenoxietanol	99,50	100,1
Ácido Benzóico	98,50	99,70
Clorfenesina	99,20	99,80
Clorhexidina	98,20	101,1
Ácido Sórbico	99,40	100,2
Metilparabeno	98,40	98,90
Etilparabeno	99,80	100,6
Isopropilparabeno	99,40	100,5
Propilparabeno	98,50	99,40
Isobutilparabeno	99,50	100,5
Butilparabeno	102,9	101,4

Os resultados obtidos demonstraram que todas as recuperações se mantiveram entre 90 e 110%, cumprindo o critério de aceitação estabelecido: |Erro| associado ao teor estimado $\leq 10\%$.

Assim, a exatidão do método comprovou-se para todos os analitos em estudo, confirmando a proximidade entre o valor do teor do padrão e o valor efetivamente obtido, assegurando a consistência analítica em diferentes níveis de concentração.

3.1.6. Limite de Detecção e Quantificação (LOD e LOQ)

O LOD e LOQ avaliaram-se com base no padrão de controlo de menor concentração (P1) para todos os conservantes. De acordo com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P., injetaram-se seis réplicas no nível candidato a LOQ (P1), com o objetivo de verificar o limite de quantificação para cada analito. Nas curvas de calibração consideraram-se apenas duas injeções no ponto de LOQ.

Para selecionar o ponto de LOQ, aplicou-se o critério dos residuais $\leq 10\%$. Quando os residuais do P1 cumpriram este critério, considerou-se P1 como LOQ; caso contrário, adotou-se P2.

A determinação instrumental dos limites baseou-se na razão S/N do pico do analito, utilizando o ruído de linha de base (*Baseline noise*) medido no branco imediatamente anterior à injeção do padrão – P1 ou P2. Definiu-se como critério de aceitação em conformidade com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P.: S/N do LOQ ≥ 10 e o S/N do LOD ≥ 3 . Além disso, RSD% da área (LOQ) $\leq 10\%$; n= 6.

O LOQ reportou-se em $\mu\text{g/mL}$ (solução) e convertido para % (m/m).

Os valores da razão S/N e do LOD calcularam-se segundo as seguintes Equações 5 e 6, respetivamente.

$$S/N = \frac{2 \times \text{Altura}}{\text{Ruído de linha de base do branco anterior} \times 1000} \quad (5)$$

$$\text{LOD} = \frac{3}{S/N} \times \text{LOQ} \quad (6)$$

Realizaram-se seis injeções no nível de LOQ a 214 nm e 254 nm, abrangendo os nove conservantes principais, a clorhexidina e o butilparabeno, cada um com o branco imediatamente anterior correspondente.

Na Figura 45 ilustra-se um cromatograma do padrão ao nível de concentração do LOQ (P1), obtido a 254 nm.

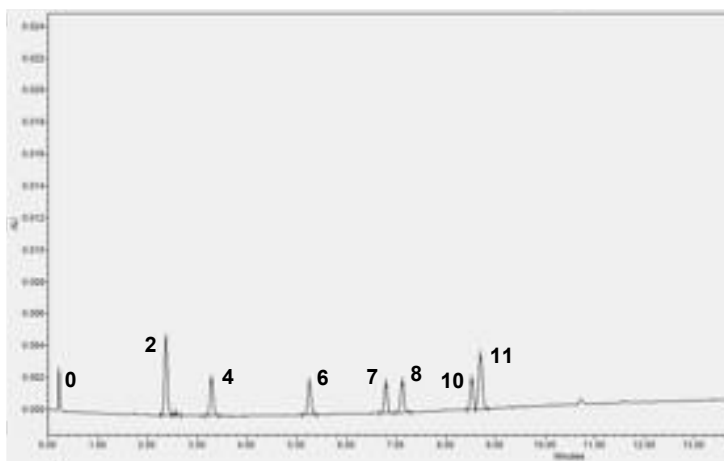


Figura 45. Cromatograma do padrão ao nível de concentração do LOQ – P1, obtido a 254 nm. Onde a ordem de eluição dos conservantes corresponde: 0 - pico do solvente, 2 - ácido sórbico, 4 - metilparabeno, 6 - etilparabeno, 7 - isopropilparabeno, 8 - propilparabeno, 10 - isobutilparabeno e 11 - butilparabeno.

Na Tabela 10 apresentam-se, para cada conservante, o ruído de linha de base do branco anterior, a média da razão S/N no ponto LOQ e o RSD% da área (n=6). Processaram-se os resultados com base no comprimento de onda mais representativo de cada analito: 214 nm para o fenoxietanol, ácido benzóico, clorfenesina e clorhexidina, e 254 nm para o ácido sórbico e os parabenos.

Tabela 10. Valores do ruído de linha de base do branco anterior, média dos valores da altura do pico, média do valor da razão S/N utilizado no ponto LOQ e RSD% da área (n=6) para cada conservante no P1.

Conservantes	Ruído de linha de base do branco anterior	Média dos valores da altura do pico	Média dos valores da S/N	RSD (área) %	LOQ (P1)		LOD	
					% (m/m)	µg/mL	% (m/m)	µg/mL
Fenoxietanol	0,139	1480	21,3	0,90	5,08E-03	1,016	7,15E-04	0,143
Ácido Benzóico	0,139	743,7	10,7	1,2	5,01E-03	1,002	1,41E-03	0,281
Clorfenesina	0,139	632,5	9,10	2,0	5,00E-03	1,000	1,65E-03	0,330
Clorhexidina	0,206	1164	11,3	1,3	4,96E-03	0,991	1,32E-03	0,263
Ácido Sórbico	0,386	4844	25,1	0,70	5,01E-03	1,002	5,99E-04	0,120
Metilparabeno	0,386	2316	12,0	0,80	5,00E-03	0,999	1,25E-03	0,250
Etilparabeno	0,386	2046	10,6	0,70	5,02E-03	1,005	1,42E-03	0,284
Isopropilparabeno	0,386	1872	9,70	1,0	4,78E-03	0,957	1,48E-03	0,296
Propilparabeno	0,386	1949	10,1	1,8	5,00E-03	1,000	1,49E-03	0,297
Isobutilparabeno	0,386	1930	10,0	0,60	5,03E-03	1,005	1,51E-03	0,301
Butilparabeno	0,270	1877	13,9	0,90	5,02E-03	1,003	1,08E-03	0,217

As razões S/N do fenoxietanol (a 214 nm) e do ácido sórbico (a 254 nm) verificaram-se, em média, superiores às dos restantes analitos, refletindo-se em picos de maior área no nível do LOQ para o ácido sórbico, sendo verificada a mesma situação para o fenoxietanol. Mesmo com o aumento da razão S/N associado a picos de maior área, a linearidade do método garante a determinação fiável do LOQ e LOD.

Em síntese, os limites do método comprovaram-se para todos os analitos em estudo, revelando-se inferiores às concentrações expectáveis nas amostras e assegurando a sensibilidade adequada à aplicação às amostras de *aftershaves*.

3.1.7. Efeito de Matriz

O efeito de matriz corresponde à influência dos constituintes da amostra na resposta analítica do método, podendo originar valores de recuperação inferiores ou superiores ao esperado. Quando a recuperação do padrão adicionado a uma amostra fortificada se situa dentro dos limites de aceitação, considera-se que não existe efeito de matriz significativo; em contrapartida, recuperações fora deste intervalo indicam a sua presença.

Os resultados de recuperação obtidos para os conservantes testados situaram-se no intervalo de 90–110%, o que comprova a adequação do método e a ausência de efeito de matriz relevante.

3.2. Amostras

A análise das amostras constituiu a etapa final do estudo, permitindo aplicar o método previamente validado ao doseamento dos conservantes em *aftershaves*. O objetivo consistiu na verificação da conformidade dos produtos com o disposto no Regulamento (CE) n.º 1223/2009, através da identificação e doseamento dos conservantes declarados na rotulagem, bem como da deteção de eventuais não conformidades.

Para cada amostra, efetuaram-se os procedimentos de preparação descritos na Metodologia (Secção 2.1.6), recorrendo à injeção de um único replicado para o *screening* e, posteriormente, a três réplicas independentes para o doseamento das soluções no sistema UPLC-PDA. O processamento realizou-se com base nos t_R e nas curvas de soluções padrão estabelecidas, utilizando o comprimento de onda mais representativo para cada analito.

Selecionaram-se cinco amostras designadas A, B, C, D e E. As amostras A, B e C pertencem à mesma marca, enquanto as amostras D e E correspondem a marcas distintas. Esta seleção permitiu contemplar cenários diferenciados relativamente à composição declarada e ao perfil de conservantes em aftershaves.

3.2.1. Screening

O screening consistiu na avaliação preliminar das amostras, com o objetivo de identificar os conservantes presentes e verificar a possibilidade de doseamento. Para tal, injetou-se apenas um replicado por amostra.

Utilizaram-se os conservantes declarados na rotulagem como referência inicial para a avaliação da conformidade entre a informação declarada e a composição efetivamente detetada. Na Tabela 11 apresentam-se os conservantes indicados na rotulagem das amostras.

Tabela 11. Conservantes declarados nos rótulos das amostras A – E.

Amostras	Conservantes declarados no rótulo
A	sem nenhum declarado
B	ácido benzóico e ácido sórbico, ambos em forma de base
C	ácido benzóico e ácido sórbico, ambos em forma de base; e fenoxietanol
D	ácido benzóico e ácido sórbico, ambos em forma de base; e clorfenesina
E	fenoxietanol e clorfenesina

Procedeu-se ao processamento dos cromatogramas obtidos a 214 nm e a 254 nm. Para cada pico observado no t_R expectável, procedeu-se à análise espectral por PDA (PDA *Spectrum*), no âmbito da especificidade, comparando-se o espectro da amostra com o da biblioteca interna nos modos de varrimento completo (espectro completo – 200 a 400 nm) e nos comprimentos de onda representativos – 214 nm e 254 nm.

A avaliação da pureza permitiu identificar picos potencialmente interferentes, considerando-se homogéneos quando *Purity Angle* < *Purity Threshold*. A correspondência espectral avaliou-se pelo critério de *library match*, sendo aceite quando o *Match Angle* < *Match Threshold*. De acordo com os procedimentos internos do INFARMED, a identificação positiva estabeleceu-se sempre que se verificou correspondência espectral, independentemente do resultado do parâmetro de pureza.

Assim, picos não homogêneos, mas com correspondência espectral consideraram-se igualmente válidos como screening positivo e sujeitos a doseamento.

Classificaram-se como não atribuíveis os picos observados em t_R não coincidentes com os conservantes alvo ou que não cumpriram os critérios de pureza e correspondência espectral, demonstrando a capacidade do método em distinguir analitos alvo de interferentes, ou seja, a sua especificidade.

Esta abordagem permitiu evidenciar que a identificação dos conservantes não se baseou unicamente no t_R , mas também na correspondência espectral, em conformidade com as normas internas do INFARMED. Assim, comprovou-se a especificidade do método através da avaliação simultânea da pureza dos picos e da sua correspondência com a biblioteca de referência, garantindo a fiabilidade da identificação.

3.2.1.1. Amostra A

Na amostra A não se declararam conservantes na rotulagem.

Procedeu-se ao *screening* nos comprimentos de onda 214 nm e 254 nm, não se tendo observado picos compatíveis com os t_R estabelecidos para os analitos em estudo. Efetuou-se igualmente a análise espectral por PDA, não se verificando correspondência com a biblioteca interna.

Na análise a 214 nm observaram-se picos adicionais atribuíveis a potenciais interferentes (ex.: pico 4, clorfenesina e clorhexidina). De forma análoga, a 254 nm detetaram-se picos compatíveis com o ácido sórbico e com o butilparabeno. Em todos os casos, apesar da pureza dos picos – picos homogêneos (*Purity Angle* < *Purity Threshold*), não se verificou correspondência espectral com a biblioteca (*Match Angle* > *Match Threshold*), não se confirmando, assim, identificação positiva. Os espectros obtidos encontram-se no Anexo I.

Assim, confirmou-se a ausência de conservantes nesta amostra, em conformidade com a informação declarada na rotulagem.

3.2.1.2. Amostra B

Na amostra B declararam-se na rotulagem dois conservantes: ácido benzóico e ácido sórbico.

Na análise a 214 nm observaram-se picos adicionais (pico 4 e o fenoxietanol). Em ambos os casos, os picos apresentaram-se homogêneos – puros (*Purity Angle* < *Purity Threshold*), mas não se verificou correspondência espectral com a biblioteca (*Match Angle* > *Match Threshold*), não se confirmando, assim, identificação positiva.

Observou-se, ainda, um pico atribuído ao ácido benzóico que não se revelou homogêneo (*Purity Angle* > *Purity Threshold*) e para o qual não se obteve correspondência espectral. Os espectros obtidos encontram-se no Anexo I.

Procedeu-se ao screening nos comprimentos de onda de 254 nm, observando-se um pico compatível com o t_R do ácido sórbico. Efetuou-se a análise espectral por PDA (PDA Spectrum), tendo-se verificado correspondência adequada entre o espectro da solução amostra e o da biblioteca interna (*Match Angle* < *Match Threshold*). Apesar de o pico não se apresentar homogêneo (*Purity Angle* > *Purity Threshold*), a identificação do ácido sórbico considerou-se positiva.

Para exemplificar a correspondência espectral, apresenta-se na Figura 46 a sobreposição do espectro obtido para o ácido sórbico com o espectro da biblioteca interna. Observou-se correspondência adequada entre ambos, confirmando a identificação positiva do analito. A biblioteca interna para o ácido sórbico compreendia dois espectros, ambos com match neste analito.

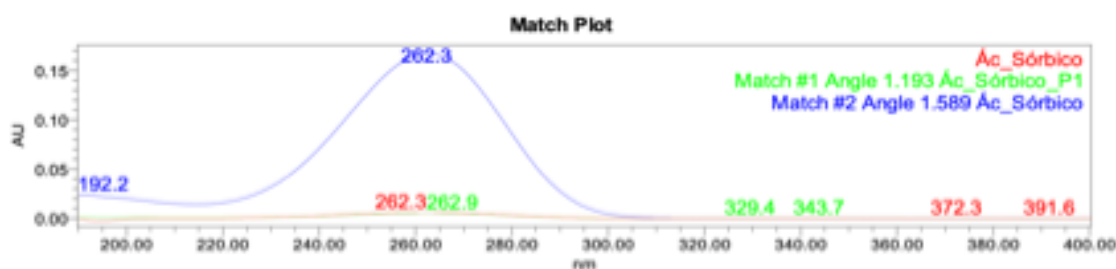


Figura 46. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra B), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra (vermelho).

Com o intuito de dissipar dúvidas, procedeu-se à fortificação da solução amostra, confirmando-se a ausência do ácido benzóico. Esta ausência constitui uma não conformidade relativamente à informação declarada na rotulagem. O cromatograma obtido encontra-se no Anexo I.

3.2.1.3. Amostra C

Na amostra C declararam-se na rotulagem três conservantes: ácido benzóico, ácido sórbico e fenoxietanol.

Na análise a 214 nm observou-se um pico compatível com o T_R do fenoxietanol. Efetuou-se a análise espectral por PDA (PDA Spectrum), tendo-se verificado coincidência adequada entre o espectro da solução amostra e o da biblioteca interna (Match Angle < Match Threshold). Apesar de o pico não se apresentar homogêneo (Purity Angle > Purity Threshold), devendo-se à existência de um pico com t_R 1,441 min que não se separa bem do pico do fenoxietanol, a identificação do fenoxietanol considerou-se positiva.

Para exemplificar a correspondência espectral, apresenta-se na Figura 47 a sobreposição do espectro obtido para o fenoxietanol com o espectro da biblioteca interna. Observou-se correspondência adequada entre ambos, confirmando a identificação positiva do analito.

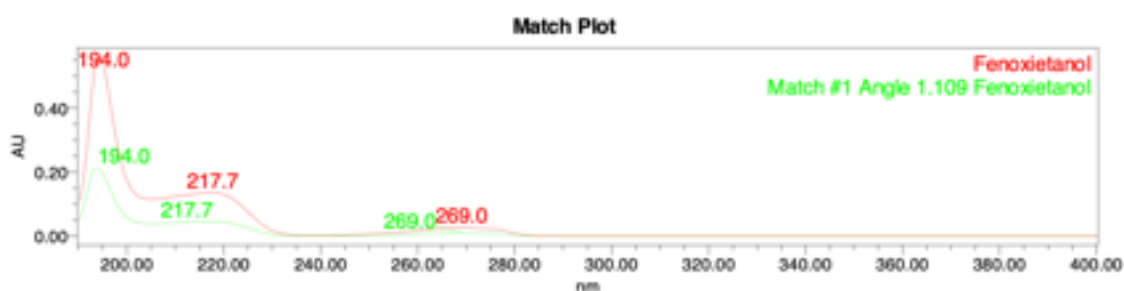


Figura 47. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Fenoxietanol (amostra C), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.

Observou-se, ainda, um pico atribuído ao ácido benzóico que se revelou homogêneo (Purity Angle < Purity Threshold), contudo não se obteve correspondência espectral. O espectro obtido encontra-se no Anexo I.

Procedeu-se ao screening nos comprimentos de onda de 254 nm, observando-se um pico compatível com o t_R do ácido sórbico. Efetuou-se a análise espectral por PDA (PDA Spectrum), tendo-se verificado correspondência adequada entre o espectro da solução amostra e o da biblioteca interna (Match Angle < Match Threshold), bem como

pureza do pico ($Purity\ Angle < Purity\ Threshold$). Confirmando-se, assim, a identificação positiva do ácido sórbico.

Para exemplificar a correspondência espectral, apresenta-se na Figura 48 a sobreposição do espectro obtido para o ácido sórbico com o espectro da biblioteca interna. Observou-se correspondência adequada entre ambos, confirmando a identificação positiva do analito. A biblioteca interna para o ácido sórbico compreendia dois espectros, ambos com match neste analito.

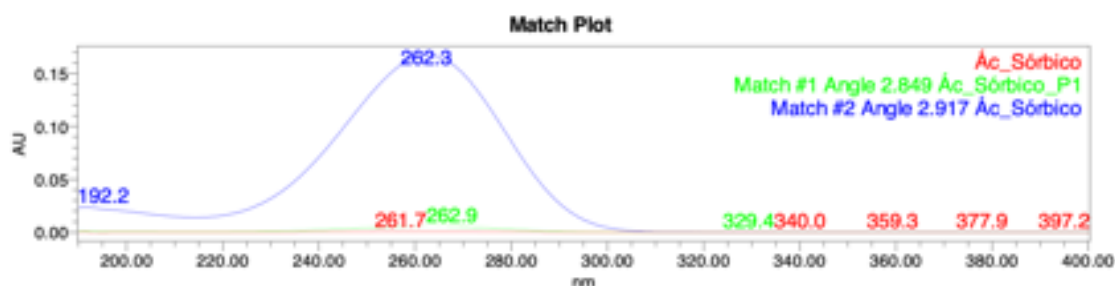


Figura 48. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra C), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra(vermelho).

Com o intuito de dissipar dúvidas, procedeu-se à fortificação da solução amostra, confirmando-se a presença do fenoxietanol (214 nm), apesar de o pico não ser puro, e do ácido sórbico (254 nm); e a ausência do ácido benzóico. Esta ausência constitui uma não conformidade relativamente à informação declarada na rotulagem. O cromatograma obtido encontra-se no Anexo I.

3.2.1.4. Amostra D

Na amostra D declararam-se na rotulagem três conservantes: ácido benzóico, ácido sórbico e clorfenesina.

Na análise a 214 nm observou-se um pico adicional, o fenoxietanol. Este revelou-se homogéneo ($Purity\ Angle < Purity\ Threshold$), mas não se verificou correspondência espectral com a biblioteca ($Match\ Angle > Match\ Threshold$), não se confirmando, assim, identificação positiva. O espectro obtido encontra-se no Anexo I.

Observou-se ainda dois picos compatíveis com o t_R do ácido benzóico e clorfenesina. Em ambos os casos, os picos apresentaram-se homogéneos ($Purity\ Angle$

$< Purity\ Threshold$), verificando-se correspondência espectral com a biblioteca ($Match\ Angle < Match\ Threshold$), confirmando-se, assim, uma identificação positiva.

Para exemplificar a correspondência espectral, apresenta-se na Figura 49 e 50 a sobreposição do espectro obtido com o espectro da biblioteca interna para o ácido benzóico e clorfenesina, respetivamente.

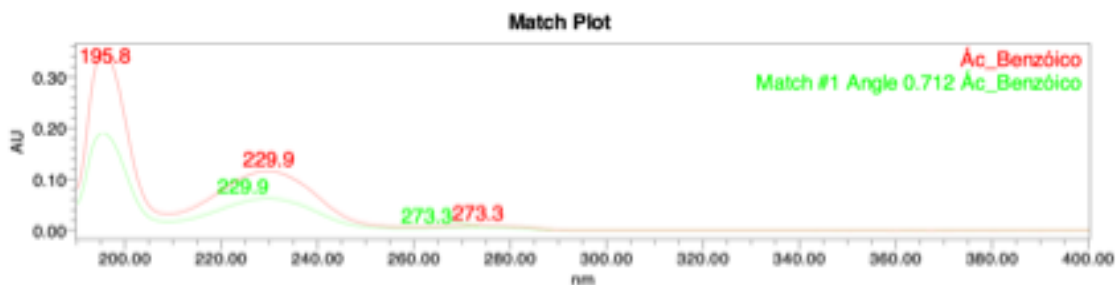


Figura 49. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Benzóico (amostra D), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.



Figura 50. Sobreposição do espectro PDA obtido para a Clorfenesina (amostra D), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.

Procedeu-se ao screening nos comprimentos de onda de 254 nm, observando-se um pico compatível com o t_R do ácido sórbico. Efetuou-se a análise espectral por PDA (PDA Spectrum), tendo-se verificado correspondência adequada entre o espectro da solução amostra e o da biblioteca interna ($Match\ Angle < Match\ Threshold$), bem como pureza do pico ($Purity\ Angle < Purity\ Threshold$). Confirmando-se, assim, a identificação positiva do ácido sórbico.

Para exemplificar a correspondência espectral, apresenta-se na Figura 51 a sobreposição do espectro obtido para o ácido sórbico com o espectro da biblioteca

interna. Observou-se correspondência adequada entre ambos, confirmando a identificação positiva do analito. A biblioteca interna para o ácido sórbico compreendia dois espectros, ambos com match neste analito.

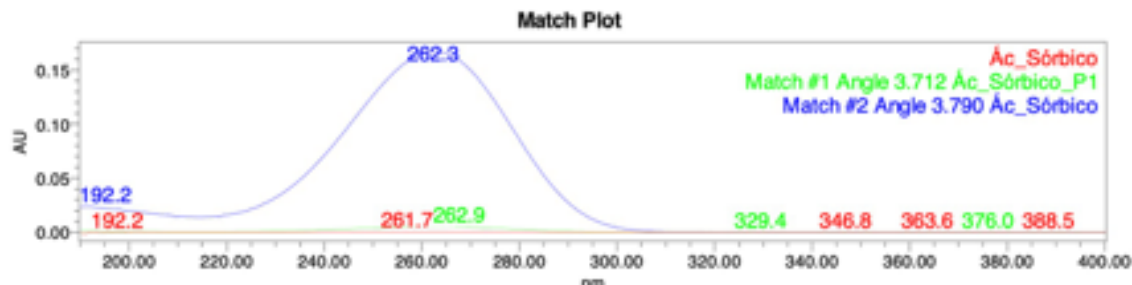


Figura 51. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra D), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra (vermelho).

Com o intuito de dissipar dúvidas, procedeu-se à fortificação da solução amostra, confirmando-se a presença do ácido benzóico e clorfenesina (214 nm) e ácido sórbico (254 nm). Esta presença constitui uma conformidade relativamente à informação declarada na rotulagem. O cromatograma obtido encontra-se no Anexo I.

3.2.1.5. Amostra E

Na amostra E declararam-se na rotulagem dois conservantes: fenoxietanol e clorfenesina.

Procedeu-se ao *screening* nos comprimentos de onda de 214 nm e 254 nm, tendo-se identificado, para além dos dois conservantes declarados (214 nm), mais dois analitos: ácido benzóico (214 nm) e ácido sórbico (254 nm).

Todos os picos observados apresentaram-se homogéneos (*Purity Angle* < *Purity Threshold*) e revelaram correspondência espectral com a biblioteca interna (*Match Angle* < *Match Threshold*). Confirmou-se, assim, a identificação positiva de quatro conservantes nesta solução amostra: fenoxietanol, clorfenesina, ácido benzóico e ácido sórbico.

Para exemplificar a correspondência espectral, apresenta-se na Figura 52 a 54 a sobreposição do espectro obtido com o espectro da biblioteca interna a 214 nm para o fenoxietanol, ácido benzóico e clorfenesina, respetivamente.

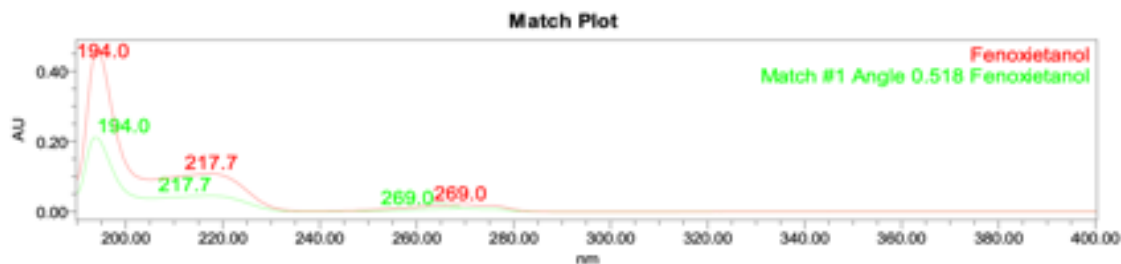


Figura 52. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Fenoxietanol (amostra E), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.



Figura 53. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Benzoico (amostra E), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral de um conservante não declarado na rotulagem.



Figura 54. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Clorfenesina (amostra E), obtido a 214 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral.

Para exemplificar a correspondência espectral, apresenta-se na Figura 55 a sobreposição do espectro obtido para o ácido sórbico com o espectro da biblioteca interna. Observou-se coincidência adequada entre ambos, confirmando a identificação positiva do analito. A biblioteca interna para o ácido sórbico compreendia dois espectros, ambos com match neste analito.

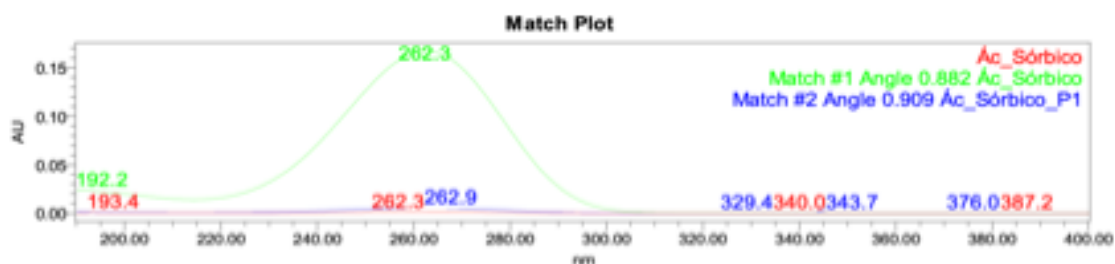


Figura 55. Sobreposição do espectro PDA obtido para o Ácido Sórbico (amostra E), obtido a 254 nm, com o espectro da biblioteca interna, confirmando a correspondência espectral de um conservante não declarado na rotulagem. Os espectros a azul e a verde encontram-se na biblioteca interna, realizando dois match com o ácido sórbico contido na solução amostra (vermelho).

A presença do ácido benzóico e do ácido sórbico constituiu uma não conformidade relativamente à informação declarada na rotulagem.

3.2.2. Doseamento

Os resultados do *screening* encontram-se resumidos na Tabela 12, permitindo comparar os conservantes declarados na rotulagem com os efetivamente identificados por *screening*.

Tabela 12. Resultados do screening para as amostras A-E, considerando os critérios de T_R , pureza do pico e correspondência espectral.

Amostras	Conservantes declarados (rotulagem)	Conservantes identificados (screening)	Observações/ Não conformidades
A	Nenhum	Nenhum	Conforme
B	Ácido Benzóico e Ácido Sórbico	Ácido Sórbico	Não Conforme - Ácido Benzóico ausente
C	Fenoxietanol, Ácido Benzóico e Ácido Sórbico	Fenoxietanol e Ácido Sórbico	Não Conforme - Ácido Benzóico ausente
D	Clorfenesina, Ácido Benzóico e Ácido Sórbico	Clorfenesina, Ácido Benzóico e Ácido Sórbico	Conforme
E	Fenoxietanol e Clorfenesina	Fenoxietanol, Clorfenesina, Ácido Benzóico e Ácido Sórbico	Não Conforme - 2 conservantes adicionais não rotulados

Assim, após a identificação, procedeu-se ao doseamento dos conservantes identificados nas amostras A-E, com o objetivo de expressar em percentagem a

quantidade efetivamente presente na amostra e, posteriormente, comparar os valores obtidos com os limites definidos no Anexo V do Regulamento (CE) nº 1223/2009.

Quando o composto está ausente ou presente em quantidade inferior ao LOD é reportado como 'detetado < LOD' e quando está presente em quantidade entre LOD e LOQ é reportado como 'detetado < LOQ'; não tendo sido atribuídos valores quantitativos.

Para os conservantes identificados, recorreu-se a três replicados independentes por amostra, assegurando a reprodutibilidade e fiabilidade dos resultados. Definiu-se como critério de aceitação: Resposta_{Branco} ≤ Resposta_{LOD}, de modo a evitar fenómenos de *carryover*.

Definiu-se ainda como critério de aceitação específico do método de ensaio, em conformidade com o procedimento interno utilizado no laboratório do INFARMED, I.P.: RSD replicados ≤ 10% (das concentrações obtidas nos replicados) e t_R do pico da solução amostra ± 0,2 minutos do t_R do pico da solução padrão, garantindo reprodutibilidade do método. O doseamento dos conservantes calculou-se em percentagem (m/m), de acordo com a Equação 7.

$$\% (m/m) = \frac{\text{massa do analito}}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (7)$$

Processaram-se os resultados do doseamento obtidos para cada solução amostra, identificando-se os conservantes quantificados, os detetados abaixo do LOQ e LOD e as situações de não conformidade face aos limites regulamentares. Para a amostra C e E para o fenoxietanol realizaram-se diluições de 1:5 e 1:2, respetivamente, devido a uma maior área apresentada relativamente à área do padrão de maior concentração da curva de calibração.

Todos os resultados obtidos cumpriram os critérios de aceitação estabelecidos, confirmando a adequação do método.

Na amostra A não se obteve *screening* positivo para nenhum dos conservantes em estudo, pelo que não se realizou qualquer doseamento. Esta amostra revelou-se,

portanto, isenta de conservantes, em conformidade com a informação declarada na rotulagem.

Relativamente à amostra B, declararam-se na rotulagem a presença de ácido benzóico e de ácido sórbico. Confirmou-se apenas o ácido sórbico, enquanto o ácido benzóico não apresentou resposta positiva, resultando na não conformidade da rotulagem. O ácido sórbico apresentou uma concentração de 0,00712% (m/m).

Na amostra C declararam-se na rotulagem a presença de ácido benzóico, ácido sórbico e fenoxietanol. Confirmaram-se o fenoxietanol e o ácido sórbico, enquanto o ácido benzóico não apresentou resposta positiva, resultando na não conformidade da rotulagem. O fenoxietanol apresentou uma concentração de 0,455% (m/m) e o ácido sórbico se registou como 'detetado < LOD', com uma concentração < 0,000599% (LOD).

Em relação à amostra D declararam-se na rotulagem a presença de clorfenesina, ácido benzóico e ácido sórbico. Confirmaram-se os três conservantes. A clorfenesina e ácido benzóico apresentaram concentrações de 0,213% (m/m) e de 0,252% (m/m), respetivamente. Já o ácido sórbico registou-se como 'detetado < LOD', com uma concentração < 0,000599% (LOD).

Finalmente, na Amostra E declararam-se na rotulagem a presença de fenoxietanol e clorfenesina. Confirmaram-se ambos e, adicionalmente, identificaram-se o ácido benzóico e ácido sórbico. O fenoxietanol e a clorfenesina apresentaram uma concentração de 0,412% (m/m) e de 0,0103% (m/m), respetivamente. Já o ácido benzóico e ácido sórbico registaram-se como 'detetado < LOQ', ambos com uma concentração < 0,0050% (LOQ).

Os resultados quantitativos encontram-se resumidos na Tabela 13.

Tabela 13. Conservantes doseados nas amostras B–E e respetivos resultados em percentagem (m/m).

Amostras	Conservante doseado	Resultado % (m/m)
B	Ácido Sórbico	0,00712
	Fenoxietanol	0,455
C	Ácido Sórbico	< LOD (5,99E-04)
	Clorfenesina	0,213
D	Ácido Benzoico	0,252
	Ácido Sórbico	< LOD (5,99E-04)
	Fenoxietanol	0,412
E	Clorfenesina	0,0103
	Ácido Benzoico	< LOQ (5,00E-03)
	Ácido Sórbico	

Importa destacar a incerteza de medição associada aos resultados obtidos. No presente estudo não se procedeu à sua estimativa, uma vez que à data o laboratório encontra-se a criar histórico para que possa proceder à estimativa da incerteza, a qual poderá ser efetuada se se obtiverem resultados quantitativos para os conservantes analisados nas amostras em avaliação, situação que não se tem verificado.

O cálculo da incerteza relativa dos analitos encontra-se atualmente em desenvolvimento no laboratório, aguardando a recolha de dados adicionais para a sua validação. Previa-se a integração dos dados gerados na validação do método desenvolvida no âmbito do presente estágio nesse processo; contudo, devido a constrangimentos de tempo, atrasos no processamento e limitações na disponibilidade de padrões, a validação não se concluiu para as amostras inicialmente previstas (desodorizantes). Assim, não se realizou a determinação da incerteza relativa para os conservantes doseados nos aftershaves.

3.3. Apreciação global

Uma simples estatística permitiu caracterizar a distribuição das amostras quanto à presença e combinação de conservantes, avaliando simultaneamente a conformidade entre a rotulagem e a composição efetivamente identificada.

No total, analisaram-se cinquenta amostras de *aftershaves* provenientes de vinte e uma marcas distintas. Observaram-se perfis variáveis quanto à presença de conservantes, desde a ausência total até combinações com três ou mais compostos.

A Figura 56 ilustra a distribuição percentual das amostras por número de conservantes declarados.

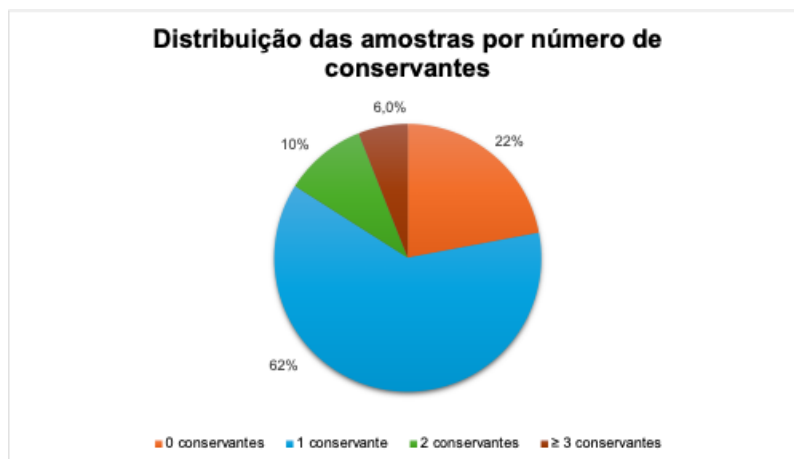


Figura 56. Distribuição das amostras por número de conservantes declarados, onde: 0 conservantes corresponde a 22%; 1 conservante corresponde a 62%; 2 conservantes corresponde a 10% e ≥ 3 conservantes corresponde a 6,0%.

A maioria das amostras (62%) apresentou apenas um conservante declarado na rotulagem. Identificaram-se com maior frequência o fenoxietanol e o ácido benzóico (sob a forma de ácido ou de sal – benzoato de sódio).

Um número reduzido de amostras (10%) revelou a presença de dois conservantes declarados. As combinações observadas incluíram: ácido benzóico + ácido sórbico, fenoxietanol + clorfenesina e fenoxietanol + ácido benzóico.

Por outro lado, em três amostras (6%) estão declarados três ou mais conservantes na rotulagem. Registraram-se as seguintes combinações: ácido benzóico + ácido sórbico + fenoxietanol e ácido benzóico + ácido sórbico + clorfenesina.

Finalmente, onze amostras (22%) não apresentaram qualquer conservante declarado na rotulagem. De forma geral, verificou-se que a maioria dos *aftershaves* recorre a formulações com apenas um conservante (62%), enquanto a utilização de misturas de dois ou mais compostos se limitou a 16% das amostras.

Após o doseamento dos conservantes, verificou-se que quarenta e três das cinquenta amostras apresentaram concordância entre a rotulagem e a composição identificada, enquanto sete amostras revelaram incoerências. A Figura 57 apresenta a percentagem de amostras conformes e não conformes relativamente à rotulagem.



Figura 57. Percentagem de amostras conformes e não conformes relativamente à rotulagem, onde 86% (43 amostras) se encontram conformes e 14% (7 amostras) não conformes.

Entre as amostras não conformes, uma (Amostra E) revelou a presença de dois conservantes adicionais não declarados, resultando na presença de quatro conservantes no total.

Nas restantes seis não conformes, detetaram-se menos conservantes do que os indicados, o que pode induzir o consumidor em erro quanto à composição real do produto. Das seis, três revelaram ausência de um conservante e uma a ausência de dois conservantes, mantendo-se, no entanto, outros conservantes presentes. Nas duas amostras restantes, constatou-se a ausência total de conservantes, apesar de um estar declarado na rotulagem. A Figura 58 apresenta as não conformidades detetadas relativamente à rotulagem.

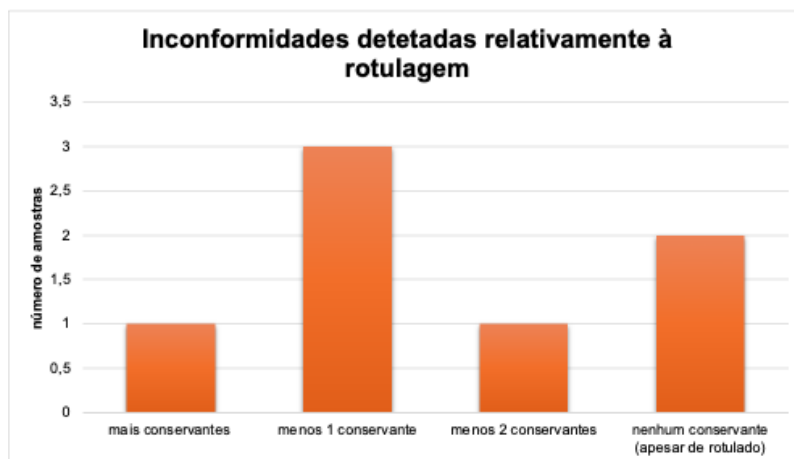


Figura 58. Não conformidades detetadas relativamente ao rótulo (1 amostra com mais conservantes do que rotulado; 3 amostras com menos 1 conservante; 1 amostra com menos 2 conservantes e 2 amostras sem qualquer conservante apesar de declarado).

Estas não conformidades, embora relativamente pouco frequentes (14%), revelam falhas relevantes na rotulagem, comprometendo a confiança do consumidor e a conformidade legal. Os resultados evidenciam a relevância da verificação laboratorial e do controlo da qualidade dos produtos cosméticos. As discrepâncias observadas entre a rotulagem e a composição real reforçam a necessidade de fiscalização rigorosa neste setor, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1223/2009.

Das cinquenta amostras de *aftershaves* analisaram-se, neste trabalho, cinco amostras (A-E), tendo em vista o doseamento dos conservantes declarados na rotulagem.

Procedeu-se à comparação dos resultados obtidos com os limites estabelecidos no Anexo V do Regulamento (CE) n.º 1223/2009, que define as substâncias conservantes autorizadas, bem como as respetivas concentrações máximas permitidas em produtos cosméticos. A Tabela 14 sintetiza os limites legais estabelecidos para os conservantes alvo deste estudo.

Tabela 14. Limites máximos permitidos para os conservantes em estudo, conforme estabelecido no Anexo V do Regulamento (CE) n.º 1223/2009.

Conservantes	Limites legais % (m/m)
Fenoxietanol	1,0
Ácido Benzoico	0,5
Clorfenesina	0,3
Clorhexidina	0,3
Ácido Sórbico	0,6
Metilparabeno	0,4
Etilparabeno	0,4
Isopropilparabeno	Proibido
Propilparabeno	0,14
Isobutilparabeno	Proibido
Butilparabeno	0,14

Em todas as soluções amostra doseadas, os teores determinados situaram-se abaixo dos limites máximos legalmente estabelecidos para os conservantes identificados, não tendo sido observada qualquer ultrapassagem dos valores regulamentares.

Para além da conformidade quantitativa, constatou-se uma predominância na utilização de determinados conservantes, em particular o fenoxietanol e os ácidos orgânicos (benzoico e sórbico), frequentemente em associação. Em contraste, observou-se uma utilização reduzida de parabenos, o que poderá refletir uma adaptação das formulações às preferências de mercado e às preocupações dos consumidores relativamente a este grupo de compostos.

Assim, do ponto de vista quantitativo, os produtos encontram-se conformes com os requisitos do referido Regulamento, como se evidencia na Tabela 15, onde se compara a concentração obtida com os limites legais definidos para os conservantes efetivamente doseados; não se encontram os conservantes detetados abaixo do LOQ.

Tabela 15. Concentração dos conservantes efetivamente doseados nas amostras B–E, em comparação com os limites legais definidos no Anexo V do Regulamento (CE) n.º 1223/2009, e indicação da conformidade.

Amostras	Conservante doseado	Conformidade com a legislação
B	Ácido Sórbico	0,00712 % < 0,6 %
C	Fenoxietanol	0,455 % < 1,0 %
D	Clorfenesina	0,213 % < 0,3%
	Ácido Benzoico	0,252 % < 0,5 %
E	Fenoxietanol	0,412 % < 1,0 %
	Clorfenesina	0,0103 % < 0,3 %

Todavia, observaram-se diversas não conformidades ao nível da rotulagem em três amostras (B, C e E). Para as amostras B e C, verificou-se a ausência de conservantes declarados na rotulagem, situação que pode induzir o consumidor em erro quanto à composição real do produto. Na amostra E, identificaram-se dois conservantes adicionais (ácido benzoico e ácido sórbico) que não constavam na rotulagem, revelando igualmente falha de conformidade. Ambas as amostra A e D revelaram-se integralmente conforme, não apresentando conservantes nem na rotulagem nem na análise laboratorial (correspondência espectral).

Estas não conformidades comprometem a transparência e a fiabilidade da informação prestada ao consumidor, em violação do disposto no artigo 19.º do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 relativo à rotulagem dos produtos cosméticos. A ausência ou omissão de substâncias conservantes pode ter implicações diretas na perceção de segurança por parte do consumidor e, conseqüentemente, na proteção da saúde pública.

Estas falhas de conformidade não se traduzem apenas em incumprimento regulamentar, mas podem igualmente impactar a perceção de segurança dos consumidores e a confiança na marca. Para a indústria, tais incongruências

representam riscos acrescidos de natureza legal e de credibilidade, reforçando a necessidade de práticas rigorosas de fabrico, atualização da rotulagem e controlo da qualidade.

Em síntese, embora todos os teores determinados se tenham situado abaixo dos limites legais, a discrepância entre a composição declarada e a composição efetivamente identificada reforça a importância da verificação laboratorial e da fiscalização contínua dos produtos cosméticos disponíveis no mercado.

4. Conclusão

O presente trabalho permitiu a validação e aplicação de um método por UPLC-PDA para a determinação de conservantes em produtos cosméticos, assegurando a adequação do procedimento às exigências regulamentares vigentes.

A validação demonstrou que o método cumpriu os critérios de desempenho estabelecidos, apresentando linearidade satisfatória ($R^2 \geq 0,999$), repetibilidade com $RSD(\text{área}) \leq 5,0\%$ e $RSD(t_R) \leq 2\%$, exatidão com recuperações no intervalo de 90–110% e limites de deteção e quantificação compatíveis com a aplicação pretendida.

A aplicação a cinquenta amostras de aftershaves comercializadas em Portugal, representando vinte e uma marcas distintas, revelou que a maioria se encontrava em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1223/2009, embora tenham sido identificadas não conformidades, nomeadamente discrepâncias entre a rotulagem e a composição determinada experimentalmente. Relativamente às amostras A-E, duas encontravam-se conformes, duas apresentavam menos conservantes do que declarado e uma apresentava dois conservantes adicionais quanto à rotulagem. Estes resultados reforçam a relevância do controlo laboratorial na monitorização de cosméticos, garantindo a confiança do consumidor.

Apesar das limitações associadas ao atraso na receção das amostras inicialmente previstas (desodorizantes), ao tempo disponível para a validação e à dificuldade no manuseamento, identificação e doseamento de alguns conservantes (como a clorhexidina e o triclocarban), o método demonstrou ser fiável, adequado e aplicável ao controlo da qualidade de produtos cosméticos.

Em termos globais, o trabalho desenvolvido contribuiu para reforçar a relevância da cromatografia líquida, e em particular da tecnologia UPLC-PDA, na monitorização de conservantes em cosméticos. Para além da consolidação de competências técnicas e analíticas, os resultados sublinham o papel essencial do controlo laboratorial no cumprimento da legislação europeia e na proteção da saúde pública.

Como perspetivas futuras, sugere-se a extensão da validação a outros parâmetros, como a robustez e a precisão intermédia, bem como a aplicação do método a diferentes matrizes cosméticas, incluindo desodorizantes (como previsto), loções e cremes. A comparação com técnicas mais sensíveis, como LC-MS/MS, poderá complementar a

informação obtida e aprofundar o conhecimento sobre o perfil de conservantes em cosméticos.

5. Referências Bibliográficas

- [1] INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (s.d.). Página inicial. <https://www.infarmed.pt>; Página relativa aos cosméticos: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos>.
- [2] Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia. (2009). Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de novembro de 2009, relativo aos produtos cosméticos. Jornal Oficial da União Europeia, L 342, 59–209. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32009R1223>.
- [3] [Kaushik, M., Farooq, U., Ali, M. S., Ansari, M. J., Iqbal, Z., & Mirza, M. A. (2023). Safety concern and regulatory status of chemicals used in cosmetics and personal care products. *Dermato*, 3(2), 131-157.
- [4] Manteghi, M. (2017). European cosmetics industry: Main aspects and regulation. Available at SSRN 3082290.
- [5] JN, O., Udebuani, A. C., Ezeji, E. U., Obasi, K. O., & Nnoli, M. C. (2015). Possible health implications associated with cosmetics: a. *Science*, 3(5-1), 58-63.
- [6] Aoyama, A., Doi, T., Tagami, T., & Kajimura, K. (2014). Simultaneous determination of 11 preservatives in cosmetics by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, 52(9), 1010-1015.
- [7] Tang, Z., & Du, Q. (2024). Mechanism of Action of Preservatives in Cosmetics. *Journal of Dermatologic Science and Cosmetic Technology*, 100054.
- [8] Khan, A. D., & Alam, M. N. (2019). Cosmetics and their associated adverse effects: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, 1-6.
- [9] Lee, M. R., Lin, C. Y., Li, Z. G., & Tsai, T. F. (2006). Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1120(1-2), 244-251.

- [10] Wu, T., Wang, C., Wang, X., & Ma, Q. (2008). Simultaneous determination of 21 preservatives in cosmetics by ultra performance liquid chromatography. *International journal of cosmetic science*, 30(5), 367-372.
- [11] Baranowska, I., Wojciechowska, I., Solarz, N., & Krutysza, E. (2014). Determination of preservatives in cosmetics, cleaning agents and pharmaceuticals using fast liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, 52(1), 88-94.
- [12] Darbre, P. D., & Harvey, P. W. (2008). Paraben esters: Review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, 28(5), 561–578.
- [13] Herman, A., & Herman, A. P. (2014). Safety of cosmetic ingredients: Preservatives. *Journal of Applied Toxicology*, 34(11), 1367–1382.
- [14] Lodén, M., Andersson, A. C., Lindberg, M., & Wessman, C. (2016). Multifunctional cosmetic ingredients: Concepts and examples. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(1), 14–22.
- [15] Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., & Barat, J. M. (2019). Antimicrobial properties of plant-derived essential oils and extracts in cosmetics: A review. *Cosmetics*, 6(4), 48.
- [16] Satyal, P., Shrestha, S., & Setzer, W. N. (2017). Essential oils as natural preservatives: A comprehensive review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S1866–S1893.
- [17] Baranowska, I., & Wojciechowska, I. (2013). The Determination of Preservatives in Cosmetics and Environmental Waters by HPLC. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(6).
- [18] Balireddi, V., Tatikonda, K. M., Tirukkovalluri, S. R., Teja, S. B., & Manne, S. (2015). Simultaneous determination of multiple preservatives and antioxidants in topical products by ultra-pressure liquid chromatography with photo diode array detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(14), 1361-1370.
- [19] Yapar, E. A., Civil, N., & Üncüoğlu, E. (2018). Detection and quantification of preservatives in green cosmetics. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(2), 72-77.

[20] Simões, A. G. (2022). Traços de higiene e cosmética no Portugal Novecentista. In S. F. Miranda & A. G. Simões (Eds.), *Higiene, saúde e sociedade: Estudos sobre Medicina, Farmácia e Educação nos séculos XIX e XX* (pp. 263–294). Cidehus. <https://books.openedition.org/cidehus/18595>

[21] Ferreira, M. S., de Oliveira, A. P., Oliveira, R., de Oliveira, R. P., Lobo, J. M. S., & Almeida, I. (2021). Regulamentação dos produtos cosméticos: uma perspetiva da evolução em Portugal e na União Europeia. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 10(1), 4-18.

[22] INFARMED. (2023). Cronologia Regulamentar Cosméticos em Portugal. https://app10.infarmed.pt/25_anos/cronologia/cosmeticos.html

[23] Critical Catalyst. (s.d.). O uso de conservantes em produtos cosméticos. Retirado em 24 de agosto de 2025, de <https://criticalcatalyst.com/pt/o-uso-de-conservantes-em-produtos-cosmeticos/>

[24] Analytical Method for the Identification and Assay of Kojic Acid, Methylparaben, and Propylparaben in Cosmetic Products Using UPLC: Application of ISO 12787:2011 Standard

[25] Souza, B. M. C., & Serrão, C. K. R. (2024). Desmistificando os parabenos: verdades por trás dos conservantes cosméticos. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 6(10), 4603-4613.

[26] Fernandes, M. C., et al. (2013). Tese de “Uso de parabenos em alimentos e o seu impacto para saúde humana.” in repositório unifesp. <https://repositorio.unifesp.br/server/api/core/bitstreams/88358a4a-cff2-4125-ac11-8bef9bc78a4d/content>.

[27] Clarins. (2018). Silicones, parabenos, sulfatos.... Dizemos-lhe tudo. <https://www.clarins.pt/beauty-faq/ingredientes/substancias-nocivas/>

[28] Oliveira, V. D. (2021). Tese de “O uso de conservantes em formulações cosméticas: cenário atual e perspectivas.” Universidade de São Paulo. https://bdta.abcd.usp.br/directbitstream/7b46f9da-9b1d-4282-a30e-411341cde139/TCC_Vinicius_Delbianco_de_Oliveira.pdf

[29] Nivea. (2025). O que são e os benefícios dos parabenos nos seus produtos. <https://www.nivea.pt/conselhos/pele-bonita/parabenos-em-cosmeticos>

[30] Mãe-Me-Quer. (2025). Parabenos: afinal são perigosos ou não? <https://maemequer.pt/a-vida-com-o-seu-bebe/saude-e-seguranca/parabenos-afinal-sao-perigosos-ou-nao/>

[31] Vieira, E. A. et al. (2022). Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de metilparabeno e propilparabeno no processo de fabricação do paracetamol. PDF. Disponível em https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/05/1428767/desenvolvimento-e-validacao-de-metodo-analitico-para-determina_yAgCIVc.pdf

[32] Universidade do Algarve. (2023). Revisão do potencial toxicológico de excipientes com aplicação em cosméticos. PDF. Disponível em <https://sapientia.ualg.pt/bitstreams/e6e745c8-5578-4608-929c-12a495169b8b/download>

[33] Merck KGaA. (n.d.). Product information. Sigma-Aldrich. Retrieved August 25, 2025, from <https://www.sigmaaldrich.com>

[34] Gorja, A., Medala, P., Madhavi, M., & Goud, G. M. (2025). A review on ultra performance liquid chromatography. Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences, 11(4), 279–286.

[35] Waters Corporation. (2025). Formação HPLC, UPLC em Empower [Apresentação em PowerPoint]. INFARMED, I.P.

[36] INFARMED, I.P. (2025). Notas de formação e procedimentos internos em cromatografia líquida. [Material interno de estágio].

[37] Iram, F., Alam, P., Siddiqui, N. A., Alqasoumi, S. I., Siddiqui, A. A., Khan, S. A., & Husain, A. (2017). Development of a stress induced validated UPLC-PDA stability indicating method for Eplerenone. International Journal of Pharmaceutical Research, 9(4). <https://www.greenpharmacy.info/index.php/ijgp/article/view/1630/856>

[38] Xiu-Qin, L., Chao, J., Wei, Y., Yun, L., Min-Li, Y., & Xiao-Gang, C. (2008). UPLC-PDAD analysis for simultaneous determination of ten synthetic preservatives in foodstuff. Chromatographia, 68, 57-63.

- [39] Nahar, L., Chaiwut, P., Sangthong, S., Theansungnoen, T., & Sarker, S. D. (2024). Progress in the analysis of phytocannabinoids by HPLC and UPLC (or UHPLC) during 2020-2023. *Phytochemical analysis: PCA*, 35(5), 927–989.
- [40] UPLC Analysis of Common Parabens in Cosmetic Products, DOI: 10.1556/ACHrom.21.2009.4.6.
- [41] Ducup de Saint Paul, L., Ravier, S., Wortham, H., Maupetit, F., Nicolas, M., & Quivet, E. (2021). Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the quantification of isothiazolinones in the composition and emissions from consumer products. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 413(26), 6617–6626.
- [42] Waters Corporation. (2015). High throughput analysis of phthalates and parabens in cosmetics and personal care products with UPLC. Application Note.
- [43] Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 1(20), 05
- [44] International Organization for Standardization. (2017). *ISO/IEC 17025:2017 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva, Switzerland: ISO.
- [45] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2023). *European Pharmacopoeia* (11th ed.). Strasbourg, France: Council of Europe.
- [46] International Organization for Standardization. (2011). *ISO 12787: Cosmetics — Analytical methods — Validation criteria*. Geneva: ISO.
- [47] B. Magnusson e U.Örnemark, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2.a ed. 2014. Disponível em: www.eurachem.org.
- [48] de Kok Food, A., Product, C., VWA, S. A., Fernández-Alba, A. R., Gamón, M., Valenciana, G., ... & Valverde, A. (2007). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- [49] Brito, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13.

[50] RELACRE. (2013). *Guia RELACRE n.º 13: Validação de métodos de ensaio químicos*. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE).

[51] European Medicines Agency. (2011). *Guideline on bioanalytical method validation*. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

[52] KRUIVE, A., REBANE, R., KIPPER, K., OLDEKOP, M. L., EVARD, H., HERODES, K., RAVIO, P. & LEITO, I. 2015b. Tutorial review on validation of liquid chromatography-massspectrometry methods: part II. *Anal Chim Acta*, 870, 8-28.

[53] SANTE/11312/2021 2021. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, European Commission.

6. Anexos

6.1. Anexo I

▪ Amostra A



Figura A.1. Espectro PDA do Pico 4 (amostra A) obtido a 214 nm. O pico revelou-se homogêneo, contudo não apresentou correspondência com a biblioteca.

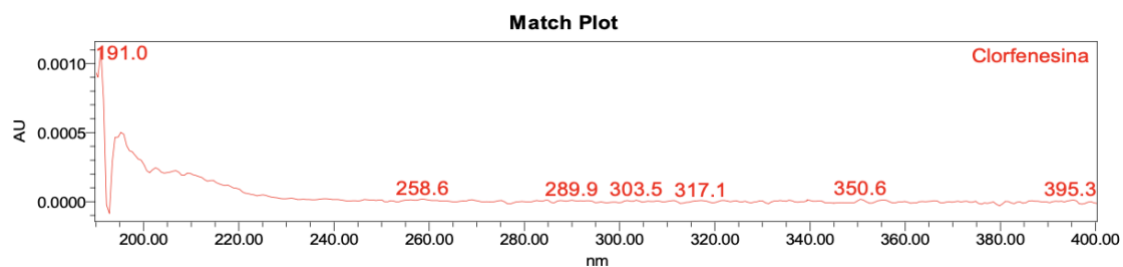


Figura A.2. Espectro PDA da Clorfenesina (amostra A) obtido a 214 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca.

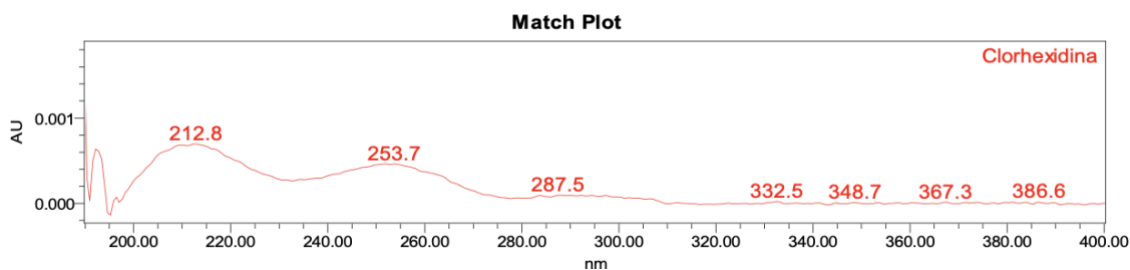


Figura A.3. Espectro PDA da Clorhexidina (amostra A) obtido a 214 nm, sem correspondência com a biblioteca.

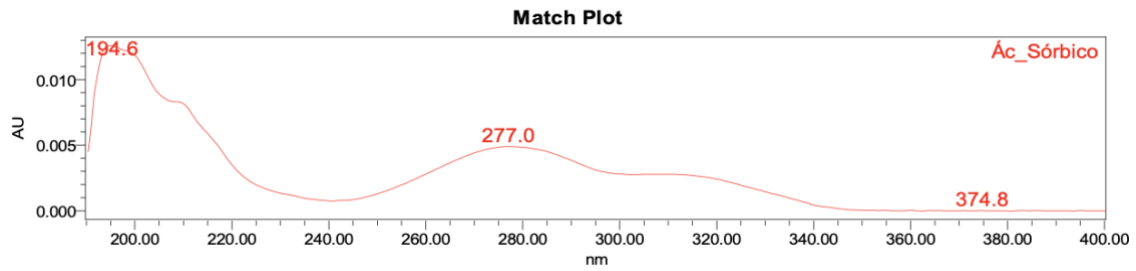


Figura A.4. Espectro PDA do Ácido Sórbico (amostra A) obtido a 254 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca.

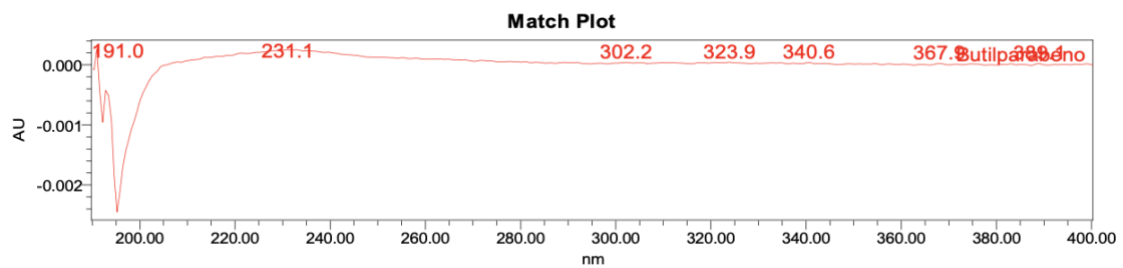


Figura A.5. Espectro PDA do Butilparabeno (amostra A) obtido a 254 nm, sem correspondência com a biblioteca.

▪ Amostra B

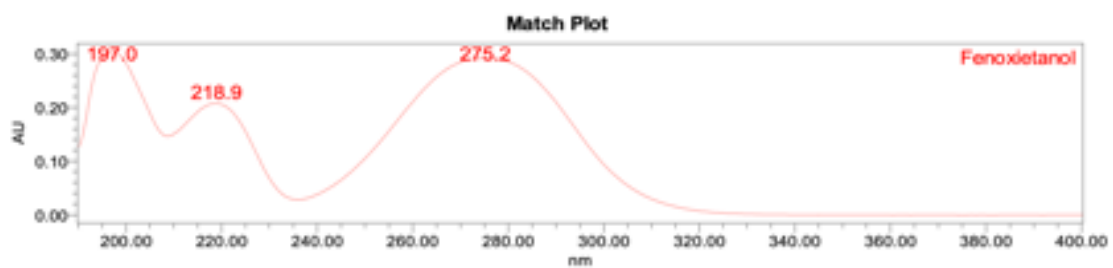


Figura A.6. Espectro PDA do Fenoxietanol (amostra B) obtido a 214 nm. O pico revelou-se homogêneo, contudo não apresentou correspondência com a biblioteca.

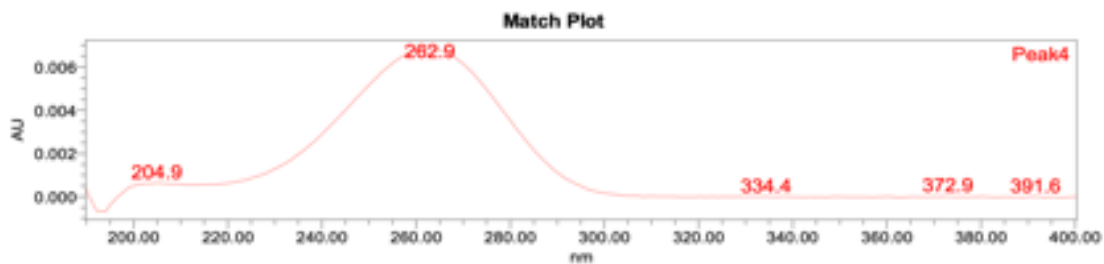


Figura A.7. Espectro PDA do Pico 4 (amostra B) obtido a 214 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca.

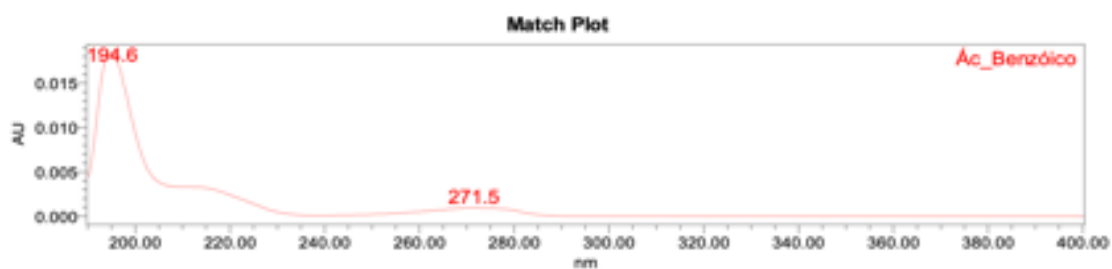


Figura A.8. Espectro PDA do Ácido Benzoico (amostra B) obtido a 214 nm, sem homogeneidade do pico nem correspondência com a biblioteca.

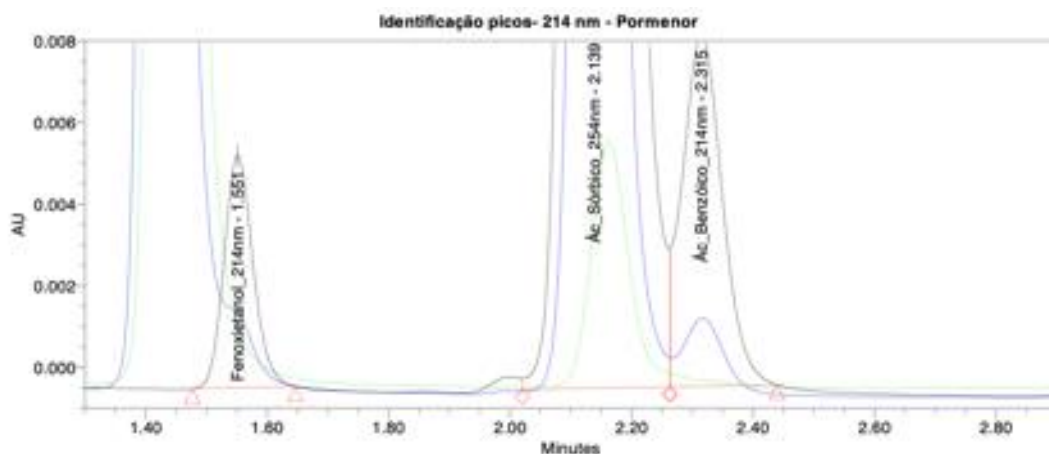


Figura A.9. Fortificação da Amostra B: sobreposição do cromatograma PDA da amostra B (verde), obtido a 254 nm, com o cromatograma PDA do padrão de controlo P7 (preto) e com o cromatograma PDA da amostra B fortificada (azul), concluindo-se que a amostra tem ácido sórbico, mas não ácido benzoico. O pequeno pico a azul no t_R do ácido benzoico apenas se deve ao padrão de controlo contido na solução amostra fortificada.

▪ Amostra C

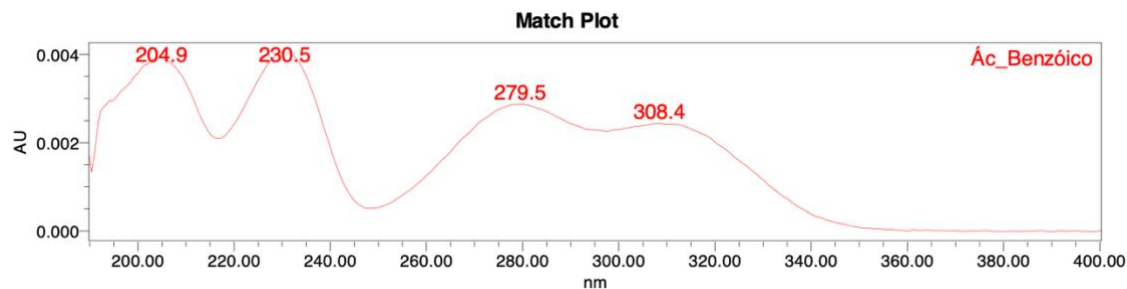


Figura A.10. Espectro PDA do Ácido Benzoico (amostra C) obtido a 214 nm. O pico revelou-se homogêneo, contudo não apresentou correspondência com a biblioteca.

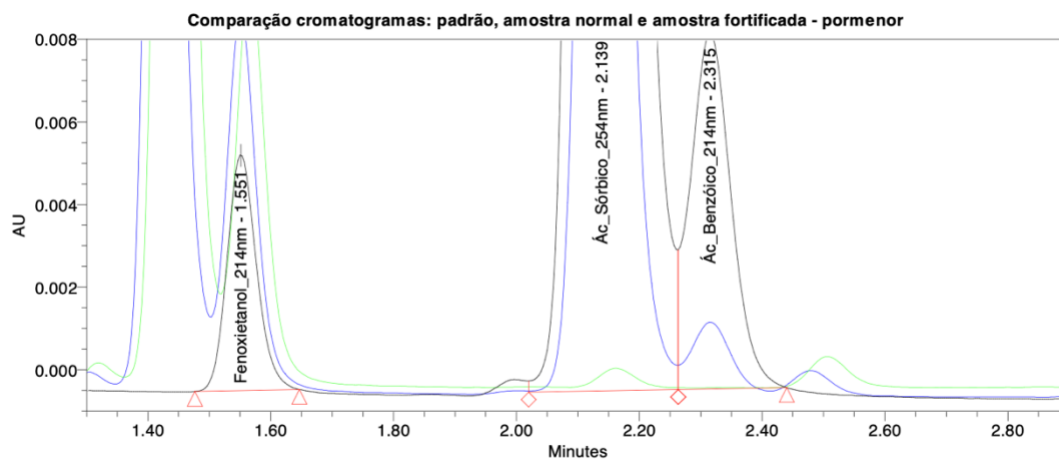


Figura A.11. Fortificação da Amostra C: sobreposição do cromatograma PDA da amostra C (verde), obtido a 254 nm, com o cromatograma PDA do padrão de controlo P7 (preto) e com o cromatograma PDA da amostra C fortificada (azul), concluindo-se que a solução amostra tem ácido sórbico e fenoxietanol, mas não ácido benzoico. O pequeno pico a azul no t_R do ácido benzoico apenas se deve ao padrão de controlo contido na amostra fortificada.

▪ Amostra D

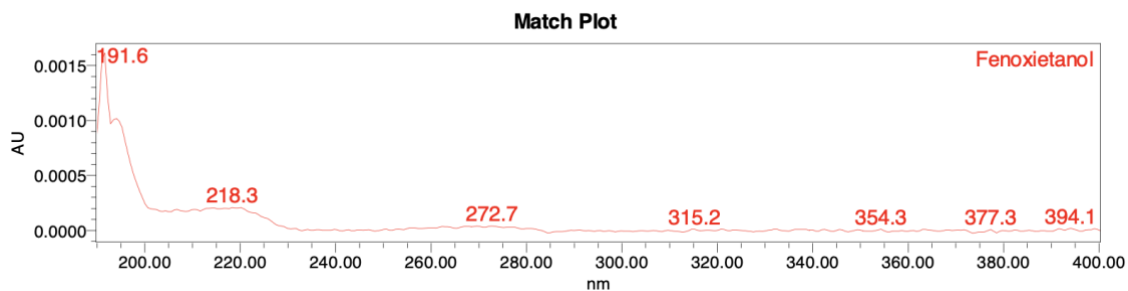


Figura A.12. Espectro PDA do Fenoxietanol (amostra D) obtido a 214 nm. Apesar da homogeneidade do pico, não se verificou correspondência com a biblioteca.

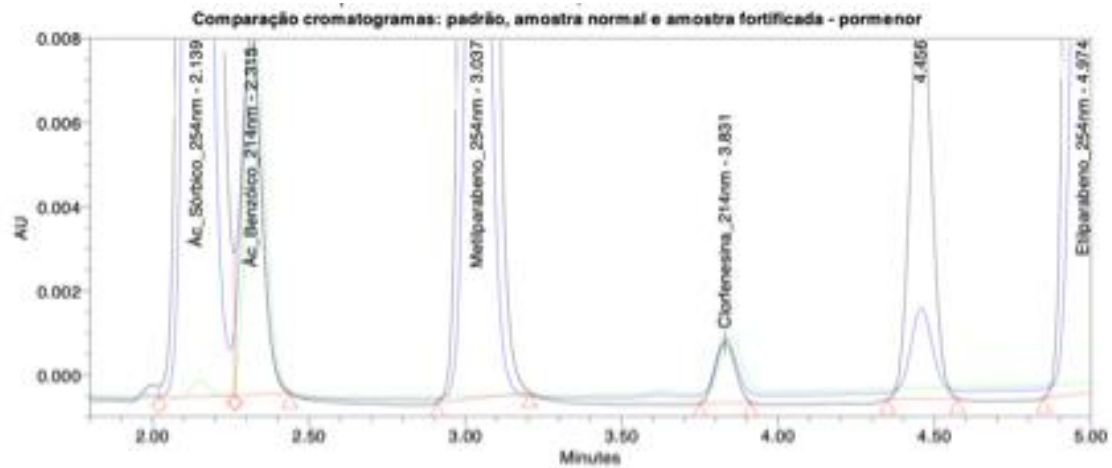


Figura A.13. Fortificação da Amostra D: sobreposição do cromatograma PDA da amostra D (verde), obtido a 254 nm, com o cromatograma PDA do padrão de controlo P7 (preto) e com o cromatograma PDA da amostra C fortificada (azul), concluindo-se que a solução amostra tem ácido benzóico, clorfenesina e ácido sórbico.