

Maria João Serralheiro Rosa

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE RESINA POR  
GC-MS, RMN E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA  
COMPOSIÇÃO E ORIGEM**

Mestrado em Química  
Departamento de Química  
FCTUC

Setembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Maria João Serralheiro Rosa

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE  
RESINA POR GC-MS, RMN E ANÁLISE  
QUIMIOMÉTRICA  
Composição e Origem**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de  
especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente**

Professora Dr<sup>a</sup> Marta Piñeiro Gomez

**Setembro 2014**

**Universidade de Coimbra**



*“Eu aprendi que a coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele.*

*O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo.”*

*Nelson Mandela*



# Agradecimentos

Foram muitos os altos e baixos ao longo deste percurso, vitórias e derrotas, alegrias e tristezas, algumas lágrimas mas principalmente muitos sorrisos e gargalhadas, porque afinal de contas eu estou cá é para analisar;

Termino assim esta etapa, onde ultrapassei muitos desafios e superei medos, com o sentimento de dever cumprido.

Para que isto tudo fosse possível não posso deixar de agradecer àqueles que sempre me apoiaram:

À Professora Dr<sup>a</sup>. Marta Piñeiro na qualidade de orientadora, agradeço pelo apoio, orientação e amizade ao longo desta etapa e por me ensinar a nunca baixar os braços e a enfrentar os meus medos;

À Mestre Sílvia Gramacho, pelo apoio, orientação e amizade neste percurso e por ter sempre uma palavra de incentivo para me dar;

À Mestre Tânia Firmino pela ajuda disponibilizada;

Ao Professor Dr. Paulo Ramos por me ter incentivado a realizar este projecto;

A todos os elementos do grupo de Química Orgânica um especial obrigado pelo apoio ao longo deste ano;

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Química pela amizade e ajuda ao longo destes anos;

Os dados de RMN foram colectados na instalação UC-RMN, que é apoiado em parte pelo FEDER - Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, através do Programa COMPETE (Programa Operacional para a Competitividade) e pelos Fundos Nacionais através da FCT -

Fundação para a Ciência e Tecnologia (Fundação para a Ciência Português e Tecnologia) por meio de doações REEQ / 481 / QUI / 2006, RECI / QEQ-QFI / 0168/2012, CENTRO-07-CT62-FEDER-002012, e Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN)-

A todas as empresas que me forneceram as amostras que tornaram este estudo possível, Euro-Yser, Respol, EuroChemicals, Resal, ProResina e Dercol.

Aos meus amigos, aqueles que sempre me apoiaram ao longo deste percurso, por aturarem as minhas neuras mas principalmente por me acompanharem nas gargalhadas, “*Levo-vos comigo prá vida*”;

Por último, quero agradecer às pessoas que estão sempre lá, nos bons e maus momentos, à minha família. A todos eles um especial obrigado, sem esquecer o pedido de desculpas pelas vezes em que estava menos bem-disposta.

Mãe e Pai, obrigada pelos esforços ao longo destes anos, mas foi com todo esse vosso apoio que agora termino esta etapa tão importante para mim.



# Índice

<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>III</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>V</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Resina.....	1
1.2. Colofónia .....	3
1.3. Terbentina .....	8
1.4. Produção de Colofónia e Terbentina em Portugal .....	9
1.5. Critério de Qualidade para a Colofónia .....	10
1.6. Produção Mundial, Comércio e Perspectivas .....	12
1.7. Aplicações da Colofónia .....	15
1.8. Métodos de Caracterização .....	18
1.9. Determinação da Concentração de Ácido Abiético numa resina.....	19
1.9.1. Selectividade e Especificidade.....	21
1.9.2. Curva de calibração e linearidade .....	22
1.9.3. Validação da Gama de Trabalho.....	25
1.9.4. Sensibilidade .....	26
1.9.5. Limiares Analíticos .....	26
1.9.6. Precisão e Exactidão .....	29
<b>2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>33</b>
2.1. Caracterização das Amostras de Colofónia .....	33
2.1.1. RMN.....	34
2.1.2. GC-MS.....	38
2.1.3. Derivatização com Diazometano.....	43

2.1.4. Análise Quimiométrica .....	55
2.1.4.1. <i>Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA)</i> .....	55
2.2. Determinação da Concentração do Ácido Abiético em Colofónia .....	58
2.2.1. Selectividade e Especificidade .....	58
2.2.2. Linearidade.....	59
2.2.3. Aceitação de Declives .....	65
2.2.4. Limiares Analíticos .....	66
2.2.5. Precisão e Exactidão .....	68
2.2.6. Resultados da Concentração de Ácido Abiético presente nas resinas em estudo	71
<b>3. Conclusões .....</b>	<b>75</b>
<b>4. Experimental .....</b>	<b>79</b>
4.1. Instrumentação .....	79
4.2. Materiais.....	79
4.3. Métodos.....	81
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>83</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da resina R2 .....	34
<b>Figura 2:</b> Espectro de RMN da resina à T <sub>ambiente</sub> durante 21 dias.....	36
<b>Figura 3:</b> Espectro de RMN da resina à T=0°C durante 21 dias .....	36
<b>Figura 4:</b> Variação da razão ácido abiético/ácido dehidroabiético em função do tempo de exposição à temperatura ambiente e a 0°C. ....	37
<b>Figura 5:</b> Cromatograma da amostra de resina R1 .....	39
<b>Figura 6:</b> Cromatograma da amostra derivatizada com CH <sub>3</sub> I e K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	40
<b>Figura 7:</b> Cromatograma da amostra derivatizada com CH <sub>3</sub> I .....	40
<b>Figura 8:</b> Cromatograma da amostra derivatizada sob irradiação de MW com CH <sub>3</sub> I e K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ...	41
<b>Figura 9:</b> Cromatograma da amostra de resina 2 derivatizada com diazometano.....	42
<b>Figura 10:</b> Cromatograma do produto da reacção com MeOH, catalisado com TFA durante 5 minutos a 100°C sob irradiação de micro-ondas .....	42
<b>Figura 11:</b> Esquema do mecanismo de derivatização do diazometano.....	43
<b>Figura 12:</b> Cromatograma da resina R10 com todos os tempos de retenção .....	45
<b>Figura 13:</b> Cromatograma do ácido abiético padrão .....	45
<b>Figura 14:</b> Espectro de massa do ácido abiético .....	46
<b>Figura 15:</b> Fragmento possível para m/z= 173.....	46
<b>Figura 16:</b> Fragmentos possíveis para m/z=185.....	47
<b>Figura 17:</b> Fragmento possível para m/z= 241 .....	47
<b>Figura 18:</b> Fragmento possível para m/z= 257 .....	47
<b>Figura 19:</b> Espectro de massa do ácido dehidroabiético .....	48
<b>Figura 20:</b> Espectro de massa a t <sub>R</sub> = 13,45 min.....	48
<b>Figura 21:</b> Espectros de massa a t <sub>R</sub> = 13,81 min .....	49
<b>Figura 22:</b> Espectros de massa a t <sub>R</sub> = 13,85 min .....	49
<b>Figura 23:</b> Dendograma correspondente ao agrupamento das 12 resinas analisadas com diferentes origens.....	55
<b>Figura 24:</b> Posição relativa das resinas provenientes de 4 países diferentes sob o plano PC1 vs PC2, (co-variância), considerando a percentagem relativa sob a forma de vectores com recuperação de total informação de cerca de 67,6% .....	57

<b>Figura 25:</b> Réplica 1 .....	60
<b>Figura 26:</b> Réplica 2 .....	60
<b>Figura 27:</b> Réplica 3 .....	61
<b>Figura 28:</b> Réplica 4 .....	61
<b>Figura 29:</b> Réplica 5 .....	62
<b>Figura 30:</b> Réplica 6 .....	62
<b>Figura 31:</b> Curva de Calibração.....	63
<b>Figura 32:</b> Análise de Residuais .....	64
<b>Figura 33:</b> Recta de Calibração sem <i>outlier</i> .....	64
<b>Figura 34:</b> Análise de residuais na ausência de <i>outlier</i> .....	65

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Fontes de Resina de Pinheiro: espécies e principais países produtores [1].....	2
<b>Tabela 2:</b> Propriedades da Colofónia [4].....	4
<b>Tabela 3:</b> Constituintes da Colofónia – ácidos resínicos [5] .....	6
<b>Tabela 4:</b> Composição da colofonia, do tall oil e da madeira da colofónia [8].....	7
<b>Tabela 5:</b> Especificação para a Colofónia [1].....	11
<b>Tabela 6:</b> Métodos de ensaio referentes à colofónia [1].....	12
<b>Tabela 7:</b> Produção e exportação estimada (toneladas) [1] .....	14
<b>Tabela 8:</b> Métodos de caracterização qualitativos e quantitativos .....	18
<b>Tabela 9:</b> Relação de ácido abiético/dehidroabiético das resinas calculada por RMN- <sup>1</sup> H.....	35
<b>Tabela 10:</b> Relação de abiético/dehidroabiético da R2 ao frio e ao ar dado por RMN- <sup>1</sup> H .....	37
<b>Tabela 11:</b> Modificação da área relativa dos ésteres de ácido abiético e dehidroabiético pela exposição ao ar a temperatura ambiente.....	44
<b>Tabela 12:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R1 .....	51
<b>Tabela 13:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R2 .....	51
<b>Tabela 14:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R3 .....	51
<b>Tabela 15:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R4 .....	52
<b>Tabela 16:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R5 .....	52
<b>Tabela 17:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R6 .....	52
<b>Tabela 18:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R7 .....	52
<b>Tabela 19:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R8 .....	53
<b>Tabela 20:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R9 .....	53
<b>Tabela 21:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R10 .....	53
<b>Tabela 22:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R12 .....	53
<b>Tabela 23:</b> Tempo de retenção, M <sup>+</sup> e % relativa da Amostra R13 .....	54
<b>Tabela 24:</b> Sinal obtido para cada padrão de concentração.....	59
<b>Tabela 25:</b> Declives das rectas .....	66
<b>Tabela 26:</b> Leituras obtidas por diluições sucessivas da solução de 0,2 mg/mL .....	67

<b>Tabela 27:</b> Leituras obtidas experimentalmente em dias diferentes para a solução padrão de 0,2 mg/mL.....	68
<b>Tabela 28:</b> Leituras obtidas experimentalmente no mesmo dia para o padrão de 0,2 mg/mL ....	69
<b>Tabela 29:</b> Leituras obtidas experimentalmente em dias diferentes para o padrão de 0,2 mg/mL .....	70
<b>Tabela 30:</b> Resultados da concentração de ácido abiético.....	71

# Abreviaturas

**ABS** – do inglês Acrylonitrile Butadiene Styrene

**ASTM** – do inglês American Society for Testing and Materials

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DSC** – do inglês Differential Scanning Calorimetry

**GC** – do inglês Gas Chromatography

**GC-MS** – do inglês Gas Chromatography – Mass Spectrometry

**HCA** – do inglês Hierarchical Cluster Analysis

**HPLC** – do inglês High Pressure – Liquid Chromatography

**ISO** – do inglês International Organization for Standardization

**IUPAC** – do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry

**IV** – Espectroscopia de Infravermelho

**LC** – Cromatografia Líquida

**LC-ESI-MS** – do inglês Liquid Chromatography - Electrospray Ionization – Mass Spectrometry

**LD** – Limite de Detecção

**LQ** – Limite de Quantificação

**MALDI-TOF-MS** – do inglês Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry

**MRC** – Material de Referência Certificado

**MW** – do inglês Microwave

**PCA** – do inglês Principal Component Analysis

**PERE** – do inglês Pentaerythritol Resin Ester

**PI** – Padrão Interno

**R** – Coeficiente de Correlação

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**TFA** – do inglês Trifluoroacetic acid

**TGA** - Termogravimetria

**TLC** – do inglês Thin Layer Chromatography





# Resumo

A colofónia, um sólido frágil, vítreo e transparente, é o componente não volátil da resina de pinheiro. Sendo um material renovável, abundante, com elevada reactividade química e biocompatibilidade tem sido utilizado em diversas aplicações tais como na fabricação de adesivos, agentes de impregnação de papel, tintas de impressão, vernizes, vários revestimentos de superfície, materiais de isolamento para indústria electrónica, borracha sintética, pastilhas elásticas, sabonetes e detergentes.

A colofónia é uma mistura complexa e variável de ácidos resínicos, ácidos diterpénicos monocarboxílicos, em proporções que dependem de factores como as espécies de madeira, localidade e o processo de recuperação. A composição da colofónia pode ainda ser afectada após a destilação pelas condições de manipulação e armazenamento. A determinação da composição da colofónia utilizada como matéria-prima nos diferentes tipos de aplicação é de grande importância para a indústria de transformação de colofónia.

Nesta dissertação apresentamos um estudo sobre a composição de resinas utilizadas por empresas portuguesas na produção de diferentes derivados. A determinação da composição das diferentes amostras de colofónia foi realizada recorrendo à cromatografia de gases acoplada com espectrometria de massa. Sendo que não é possível realizar a análise dos ácidos resínicos, de elevada polaridade e baixa volatilidade, por análise direta por cromatografia de gases (GC), foram explorados diversos métodos de derivatização. A sensibilidade dos componentes da colofónia quando expostos ao ar e a temperatura condicionou a escolha da metodologia de derivatização de modo a garantir que a composição da amostra não seja modificada durante este processo.

A análise dos espectros de massa, das amostras de colofónia derivatizada permitiu a identificação dos principais componentes da colofónia, isto é, os ácidos abiético, dehidroabiético, pimárico, isopimárico e sandarocopimárico.

A análise quimiométrica da composição das diversas amostras fornecidas pelas indústria portuguesas permitiu estabelecer a relação entre a composição da amostra e a sua origem.

Sendo que o ácido abiético é o componente principal das resinas em estudo apresenta-se uma metodologia físico-química para a determinação da concentração do ácido abiético e o estudo preliminar da validação do método analítico para a sua análise quantitativa.



# Abstract

Rosin, a fragile, glassy and transparent solid, is a nonvolatile component of pine resin. As a renewable, abundant material with high chemical reactivity and biocompatibility it has been used in different applications such as manufacture of adhesives, paper agents, printing inks, varnishes, several surface coatings, isolation materials for electronics industry, synthetic rubber, chewing gum, soaps and detergents.

Rosin is a complex and variable mixture of resin acids, monocarboxylic diterpene acids in proportions that depend on factors such as the type of woods, location and recovery process. The composition of rosin can be affected after distillation by handling and storage conditions. The determination of the composition of rosin used as raw material in the different application types is very important for the processing of rosin industry.

In this thesis we present a study about the composition of resins used by portuguese companies in the production of different products. The determination of the composition of the different samples of rosin was performed using gas chromatography coupled with mass spectrometry. As it is not possible to perform the analysis of resinic acids with high polarity and low volatility by direct by gas chromatography (GC), several methods of derivatization have been explored. The sensitivity of the components of rosin exposed to the air and temperature has conditioned the choice of methodology of derivatization in order to ensure that sample composition is not modified during this process.

The analysis of the mass spectra of rosin derivatized samples allowed the identification of the main components of rosin, i.e. abietic, dehydroabietic, pimaric, isopimaric and sandarocopimaric acids.

The chemometric analysis of the composition of the several samples provided by portuguese industry has helped to establish the relationship between the composition of the sample and its origin.

As abietic acid is the main component of the resins in this study, it is presented a physicochemical methodology for determining the concentration of abietic acid and a preliminary study of the validation of the analytical method for the quantitative analysis.



**Capítulo I**  
*Introdução*

---



# 1. Introdução

## 1.1. Resina

O *Pinus* é um dos géneros de árvores mais amplamente distribuído no hemisfério norte, que se estende desde a região polar até aos trópicos. De entre as diversas espécies destaca-se o *Pinus Merkusii* e o *Pinus Genus*, espécie amplamente plantada devido ao seu uso em larga escala como fonte de madeira e celulose.

A resina em bruto é obtida do pinheiro vivo, sendo um material grosso e pegajoso, mas normalmente ainda fluido. Trata-se de um material opaco, devido à presença de humidade, acinzentado, e, que inevitavelmente contém uma certa quantidade de detritos da floresta (agulhas de pinheiro e insectos, entre outros) quando a resina é recolhida das árvores.

A resina é obtida a partir da árvore de uma maneira análoga à obtenção da borracha com excepção de que o produto da exsudação é mais viscoso e de produção mais lenta do que o do látex da borracha. A drenagem envolve geralmente a preparação da árvore, instalação do sistema de colheita da resina, indução do fluxo de resina na árvore, aplicação de uma formulação química para estimular e manter o fluxo da resina e, por último, a colheita da resina e aplicação do estimulante em intervalos adequados. Os sistemas de drenagem utilizados nos diferentes países produtores são diferentes quanto à profundidade do corte e ao estimulante aplicado o que pode modificar a composição da resina. Em Portugal, num método análogo ao processo *Olustee*, a obtenção de resina implica a remoção da casca e a aplicação de ácido sulfúrico como estimulante numa frente estreita, com um sistema de calhas. Durante o decorrer do fluxo alguma resina solidifica antes de chegar ao vaso de colheita. A solidificação da resina sobre a frente da árvore depende da espécie de pinheiro que está a ser drenado e condiciona a composição da resina. Os métodos de drenagem utilizados não afectam negativamente a qualidade do tronco e permitem que plantações de pinheiros sejam derrubadas e utilizadas noutras aplicações quando o processo de extracção da resina está parado.

A produção mundial de resina é de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas por ano. São muitos os países produtores de resina, sendo que a China

tem dominado a produção e o comércio mundial, mas a Indonésia, Portugal e o Brasil também são importantes produtores em termos de comércio mundial.

A tabela 1 apresenta a relação das fontes de resina e do país de produção.

**Tabela 1:** Fontes de Resina de Pinheiro: espécies e principais países produtores [1]

<b>Espécies</b>	<b>País de Produção</b>
<i>Pinus elliottii</i> Engelm.	Brasil, Argentina, África do Sul
<i>Pinus massoniana</i> D. Don.	República Popular da China
<i>Pinus kesiya</i> Royale ex Gordon	República Popular da China
<i>Pinus pinaster</i> Aiton	Portugal
<i>Pinus merkusii</i> Jungh. & Vriese	Indonésia
<i>Pinus roxburghii</i> Sarg.	Índia
<i>Pinus oocarpa</i> Schiede	México, Honduras
<i>Pinus caribaea</i> Morelet	Venezuela
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Rússia
<i>Pinus halepensis</i> Miller	Grécia
<i>Pinus radiata</i> D. Don	(Quênia)

A resina é constituída por dois componentes, a colofónia e a terbentina, que se diferenciam pela sua volatilidade, sendo a colofónia a parte da resina constituída por compostos menos voláteis, um sólido frágil, transparente, brilhante e “fracamente” aromático e a terbentina a fracção que contém os elementos mais voláteis, um líquido claro com odor intenso e gosto amargo. A separação da resina, nos seus dois componentes principais, envolve duas operações básicas, a limpeza e a destilação.

A limpeza da resina engloba vários procedimentos. A lavagem com água tem como finalidade a remoção de materiais estranhos tal como cascas, folhas de pinheiro, insectos ou impurezas transportadas para o copo pela água da chuva. O tratamento com ácido oxálico é realizado para a remoção de pequenas quantidades de ferro produzido pela acção corrosiva de ácido sulfúrico no material utilizado na extracção. Após a limpeza procede-se à destilação. Neste procedimento separa-se a componente volátil (terbentina) da não volátil



(colofónia). Todo este processo obedece a operações de limpeza e de destilação da resina em bruto, a critérios de qualidade, especificações e opções de embalagens para a colofónia e terpentina.

A composição aproximada de resina em bruto que é recebida na fábrica de processamento é de 70% de colofónia, 15% de terpentina e 15% de detritos e água.

A produção anual de colofónia e terpentina é de aproximadamente 700 mil toneladas e 100 mil toneladas, respectivamente, representando centenas de milhões de euros por ano [1].

## 1.2. Colofónia

A colofónia é o principal produto obtido a partir da resina de pinheiro, a parte não volátil, após a destilação da resina, sendo um sólido frágil, vítreo e transparente. Esta matéria-prima é ainda insolúvel em água mas solúvel em muitos solventes orgânicos. A colofónia é um material renovável, abundante e complexo, composto principalmente por ácidos resínicos com elevada reactividade química e biocompatibilidade. Esta matéria-prima é conhecida como sendo amorfa e pelo facto de não possuir um ponto de fusão específico, mas sim uma ampla gama de temperatura, geralmente mais de 15°C; antes de atingir o estado líquido este ponto de transição está associado à composição complexa e aos processos químicos que acontecem durante o aquecimento tais como, isomerização e/ou a reacções de oxidação. No entanto, à temperatura ambiente, a colofónia apresenta um grave inconveniente, o seu comportamento frágil [2].

São produzidos três tipos de colofónia, diferenciados pelo método de extracção: a colofónia é aproveitada a partir de árvores vivas, a resina proveniente da madeira extraída de cepos de pinheiros e o *tall-oil* obtido como subproduto na produção de pasta de papel.

A colofónia é avaliada e vendida com base na cor, sendo os tons de amarelo-vermelho pálidos os de melhor qualidade. Existem outras características físico-químicas (tabela 2) que influenciam a qualidade e estas são largamente dependentes das espécies de pinheiro a partir do qual a resina é obtida, ou seja,

as características são determinadas pela genética mais do que pelos factores ambientais e de processamento [3].

**Tabela 2:** Propriedades da Colofónia [4]

<b>Propriedades das resinas de colofónia</b>	
<b>Estado Físico (20°C)</b>	Sólido
<b>Cor</b>	Amarelo-pálido a amarelo-escuro
<b>Cheiro</b>	Ligeiro aroma a resina
<b>Ponto de fusão (°C)</b>	66,5 – 93,4
<b>Ponto de inflamação (°C)</b>	>200
<b>Inflamabilidade</b>	Não inflamável
<b>Propriedades explosivas</b>	Não explosiva
<b>Oxidante</b>	Não
<b>Densidade relativa (20°C)</b>	1,034
<b>Pressão de vapor (124,5°C), Pa</b>	400
<b>Solubilidade em água (20°C), mg/l</b>	0,9
<b>Solubilidade em solventes</b>	Solúvel em hidrocarbonetos aromáticos e solventes clorados, ésteres e cetonas. Parcialmente solúvel em hidrocarbonetos alifáticos.
<b>Coefficiente de partição(n-octanol/água)</b>	3,0 – 6,2

A colofónia é constituída principalmente por uma mistura de ácidos do tipo abiético e do tipo pimárico com menores quantidades de compostos neutros.

A composição química da colofónia é complexa, cerca de 70 a 90% são ácidos resínicos, ácidos diterpénicos monocarboxílicos, e o restante é correspondente a ésteres, aldeídos e álcoois. Entre os ácidos resínicos, 90% são isómeros do ácido abiético e pode ser sub-dividido em dois tipos principais: os de tipo abiético (abiético, neoabiético, levopimárico, palústrico, e ácido desidroabiético) com ligações duplas conjugadas, e do tipo pimárico (ácidos isopimárico e pimárico) com ligações duplas não conjugadas, todos eles de fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O_2$  (tabela 3).

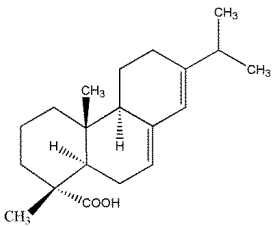
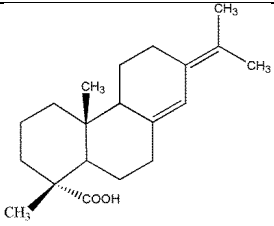
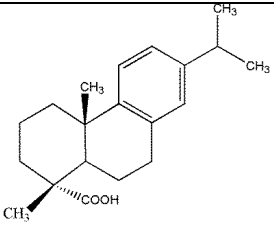
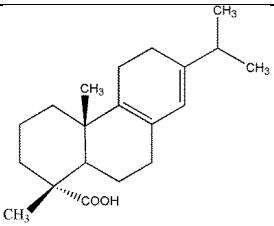
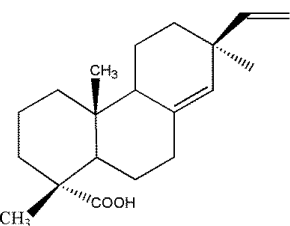
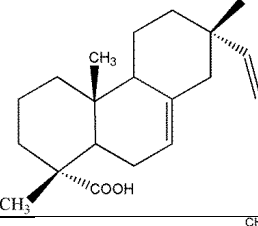
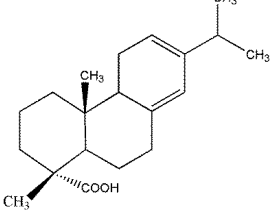
Embora todos os tipos de resina contenham os mesmos ácidos de resina, as proporções dependem de factores como as espécies de madeira, localidade, processo de recuperação, manipulação e armazenamento. Na tabela 4 apresenta-se a composição típica da colofónia e de colofónia do tipo tall-oil.

Os ácidos de resina do tipo abiético podem ser formados por isomerização do ácido abiético, termicamente (acima de 175°C) ou por tratamento com ácidos minerais diluídos. Acima de 175°C, o ácido abiético fica desproporcionado, principalmente com a formação de ácidos dehidroabiético, tetrahydroabiético e dihydroabiético. Os ácidos resínicos do tipo abiético oxidam quando expostos ao ar e à luz. Estes produtos de oxidação consideram-se os principais responsáveis pelo carácter alérgico da resina.

As funcionalidades carboxílicas e olefínicas dos ácidos resínicos são vantajosamente modificadas por hidrogenação, desproporção, formação de aductos com ácidos di-carboxílicos, dimerização, polimerização, esterificação e saponificação [6]. Algumas das aplicações requerem uma combinação de reacções para obter o produto com a qualidade desejada [7].

A maior parte da colofónia é utilizada de uma forma quimicamente modificada, em vez de ser aplicada no estado bruto. A acidez intrínseca da colofónia, juntamente com outras propriedades químicas, que lhe permite ser convertida para um grande número de derivados que são utilizados numa vasta gama de aplicações. Os derivados incluem sais, ésteres, resinas hidrogenadas, desproporcionadas e polimerizadas.

Tabela 3: Constituintes da Colofónia – ácidos resínicos [5]

Tipo de ácido	%	Estrutura	Fórmula	M (g/mol)
Abiético	24		$C_{20}H_{30}O_2$	302,45
Neoabiético	19		$C_{20}H_{30}O_2$	302,45
Dehidroabiético	5		$C_{20}H_{28}O_2$	300,44
Palústrico	21		$C_{20}H_{30}O_2$	302,45
Pimárico	5		$C_{20}H_{30}O_2$	302,45
Isopimárico	17		$C_{20}H_{30}O_2$	302,45
Levopimárico			$C_{20}H_{30}O_2$	302,45

**Tabela 4:** Composição da colofonia, do tall oil e da madeira da colofónia [8]

<b>Substância</b> <b>(ácidos resínicos individuais)</b>	<b>Colofónia</b> <b>(% m/m)</b>	<b>Tall-Oil de Colofónia</b> <b>(% m/m)</b>
<b>Ácido Abiético</b>	45,2	44,2
<b>Ácido Dehidroabiético</b>	3,3	18,1
<b>Ácido Dihidroabiético</b>	0,6	2,7
<b>Ácido Isopimárico</b>	3,6	6,6
<b>Ácido 8,5-Isopimárico</b>	0,3	1,4
<b>Ácido Levopimárico</b>	0,4	2,5
<b>Ácido Neoabiético</b>	14,0	3,9
<b>Ácido Palustrico</b>	19,2	7,8
<b>Ácido Pimárico</b>	7,4	3,7
<b>Ácido Sandarocopimárico</b>	1,5	2,5
<b>Dímeros</b>	1,0	< 0,1
<b>Outros</b>	3,5	6,6
<b>Total Ácidos Resínicos na amostra</b>	93,7	93,4

As suas aplicações mais importantes são na fabricação de adesivos, agentes de impregnação de papel, tintas de impressão, vernizes, soldas e fluxos, vários revestimentos de superfície, materiais de isolamento para indústria electrónica, borracha sintética, pastilhas elásticas, sabonetes e detergentes. A colofónia (e a maioria dos seus produtos) é utilizada no papel de revestimento (ceras, vernizes e colas), em indústrias de polímeros e produtos alimentares, bem como precursor para o fluxo de solda.

Apesar de ser mais económico para a fabricação de derivados, se grandes quantidades de resina estiverem envolvidas, os pequenos produtores fabricam muitas vezes derivados simples para venda em mercado interno como um substituto para os produtos importados.

Os derivados da resina são obtidos na presença de bases, sendo amplamente utilizados como sabões. Com ácidos (di) carboxílicos (maleico e fumárico, principalmente) são produzidos alguns produtos de adição, no sentido

de obter estabilidade à oxidação. A dimerização de ácidos de colofónia é uma outra estratégia para reduzir o número de ligações duplas e para melhorar a estabilidade oxidativa. Usando hidrogénio e médias pressões, ou simplesmente aquecendo, com ou sem alguns catalisadores, a resina hidrogenada e desproporcionada é produzida para a indústria de polímeros.

A esterificação com metanol e com etileno-glicol, glicerol e pentaeritrol produz ésteres para variadas aplicações. Estes são usados como promotores de adesividade para adesivos de fusão a quente e sob pressão, através de fluxos de solda, como promotores de cristalização para a produção de polipropileno, como neutralizadores na indústria do papel, na formulação de pastilhas elásticas, e para o fabrico de revestimentos poliméricos utilizados na controlada dispersão de drogas e produtos fitossanitários, entre outras aplicações [9].

A quantidade de ácido abiético e ácido dehidroabiético presente na colofónia, condiciona o tipo de aplicação onde a colofónia pode ser utilizada, por exemplo, baixas percentagens de abiético são requeridas para utilização como adesivos e baixas concentrações de dehidroabiético são importantes para utilização na goma de pastilhas elásticas [7].

### 1.3. Terbentina

A terbentina, componente volátil após o processo de destilação, é uma mistura de compostos orgânicos, principalmente terpenos, e a sua composição pode variar consideravelmente, mais do que a da colofónia, de acordo com as espécies de pinheiro a partir do qual foi extraída, o que influencia muito o seu valor e a sua aplicação final. É um líquido claro, inflamável, com um odor intenso e gosto amargo, imiscível em água e possui ponto de ebulição entre 150° e 170°C, sendo estas algumas das suas propriedades.

Para algumas aplicações a terbentina é utilizada na forma integral, geralmente, como um solvente para tintas e vernizes ou como agente de limpeza. No entanto, como a colofónia é quimicamente muito versátil, hoje em dia é usada principalmente depois de processamento adicional. Geralmente é submetida a destilação fraccionada para isolar produtos químicos desejáveis,

principalmente alfa-pineno e beta-pineno, que são em seguida transformados em derivados de valor acrescentado.

Ocasionalmente, a terbentina é suficientemente rica em alfa-pineno, por exemplo, quando é utilizada em forma integral. Os derivados são amplamente utilizados em perfumaria, em indústria alimentar, e para produção de resina de politerpeno, formando a base de uma indústria química substancial e crescente. O maior derivado da terbentina, o óleo de pinho sintético, é usado em desinfectantes, agentes de limpeza e outros produtos com “odor de pinheiro”. Muitos derivados, incluindo o acetato de isoborneol, a cânfora, o linaol, o citral, o citranelol, o citrolenal e o mentol são usados isoladamente ou na elaboração de outros componentes de fragrâncias e sabores [1].

#### 1.4. Produção de Colofónia e Terbentina em Portugal

O esquema do processo seguido em Portugal é baseado nos mesmos princípios que levaram ao desenvolvimento do processo *Olustee* nos Estados Unidos, mas em algumas unidades que constituem a planta diferem na concepção e capacidade.

“Depósitos” de metal contendo a resina são descarregados no tanque. Para facilitar o esvaziamento dos cilindros (parte mais trabalhosa do processo), uma secção rectangular (medindo 25 cm x 15 cm) é cortada de lado antes da utilização. A secção é depois substituída, mas pode ser facilmente removida, conforme for necessário. Após a recepção, os depósitos são colocados de lado para a abertura do tanque e a resina é forçada a sair com auxílio de grandes espátulas. A resina retirada do tanque é colocada directamente no misturador sem transferência intermédia. O misturador, em vez de ser apenas um recipiente que contém o aparelho de medição da fusão, incorpora um agitador, de modo que os conteúdos, incluindo a terbentina e o ácido oxálico (se utilizado) possam ser misturados, bem como aquecidos. Outra diferença significativa é a adição de água de lavagem na forma de vapor (até 10%), nesta fase, em vez de ser na forma líquida, numa fase posterior.

A mistura quente é em seguida passada através de uma grelha metálica para retirar as impurezas sólidas maiores. Isto ocorre num recipiente separado, em vez de ser na parte inferior do aparelho de fusão (como no processo *Olustee*).

Uma pasta de terra é adicionada a partir de outro recipiente e, em seguida, a mistura rastreada passa através de um filtro fino. A mistura quente e filtrada passa para uma das várias garrafas no qual a porção aquosa é ajustada, geralmente durante a noite. Uma carga a partir do misturador é suficiente para encher um decantador (ao contrário do sistema *Olustee* onde um tanque de lavagem leva 4 a 7 cargas do aparelho de fusão).

Os lotes e destilações contínuas são realizados em Portugal e, apesar do destilador de carga ser predominante, a taxa de transferência é maior do que a taxa que é possível com destilação contínua, significando que uma proporção significativa da produção portuguesa é obtida deste modo. Os aparelhos de destilação em Portugal são relativamente pequenos, com uma capacidade de 0,5 a 1 tonelada e a duração da destilação é curta, cerca de 20 a 30 minutos.

O aço inoxidável é novamente o principal material de construção. Os misturadores e decantadores têm cerca de 5 a 7 toneladas de capacidade e geralmente há pelo menos quatro decantadores para proporcionar um fornecimento constante de material para destilação [1].

### 1.5. Crítério de Qualidade para a Colofónia

Não há padrões internacionais para a resina, e embora a Sociedade Americana de Testes e Materiais (do inglês American Society for Testing and Materials) descreva métodos de ensaio normalizados, não estipula nenhuma especificação a que resina deve obedecer. Os órgãos de controlo apropriados de alguns países produtores fornecem especificações, mas, inevitavelmente, as empresas e comerciantes envolvidos na indústria de resina têm as suas próprias especificações que variam de empresa para empresa, e isso faz com que seja difícil generalizar e indicar dados analíticos “típicos”.

A tabela 5 foi compilada a partir de fontes comerciais, e apresenta algumas especificações para a colofónia de diferentes origens e pode ser utilizada como um guia para a avaliação da aceitação dos dados, tais como o



conteúdo de óleo volátil, a matéria insolúvel, cinzas e ferro (que é desejável que apresentem valores baixos), que pode ser especificado pelos produtores de resina. Outras propriedades, que não estão tão bem definidas, tais como a tendência da resina para cristalizar (o que é indesejável), também afectam o seu valor; a colofónia chinesa e, em certa medida, a indonésia têm esta particular lacuna.

**Tabela 5:** Especificação para a Colofónia [1]

Origem	Cor	Ponto de Amolecimento (°C)	Nº Acidez	Nº Saponificação	% de Insaponificação
China	WW	70/85	162-175	-	Max 7.5
Portugal	WW	Min 70	165-171	171-177	4,3 – 5,5
Brasil	X/WW	70-78	155-170	165-185	Max 10
Indonésia	WW/WG	75-78	160-200	170-210	-

De entre os critérios que determinam a qualidade de resina e a sua aceitabilidade para diferentes aplicações, a cor e ponto de amolecimento são geralmente indicadores suficientes de qualidade para satisfazer os compradores de resina a partir de fontes tradicionais e comprovadas.

A colofónia é classificada com base na cor, sendo o pálido o mais desejável e designado WW \* (“branco-água”). Esta classe e o grau um pouco menor, WG ('janela - vidro') são as resinas mais valorizadas. As restantes cores da colofónia classificam-se por letras. Um grau superior, X, graus mais escuros são N, M, K, I, H e inferior.

Para além da cor, um ponto de amolecimento na gama de 70-80° C é habitual, sendo a extremidade superior da faixa que representa a melhor qualidade.

Uma vez que a colofónia é um material ácido e o fabrico de derivados depende da sua funcionalidade ácida, um número elevado de ácido (e número de

saponificação) é também uma indicação de boa qualidade. A colofónia de melhor qualidade, normalmente tem um número ácido na gama de 160-170. Desde que o número de ácido é maior, a composição de ácidos de resina detalhada de colofónia é geralmente de pouca importância ou interesse para o utilizador final. Uma excepção é a colofónia derivada de *Pinus merkusii* que, devido à presença de um ácido de resina bastante raro, tem um número de ácido que é mais elevado do que o normal, podendo chegar a 190 ou mais. A percentagem de insaponificável indica a quantidade de material não-acídico na resina, de modo a diminuir este valor; qualquer valor acima de 10% de matéria insaponificável seria considerado uma resina de pior qualidade.

Para a determinação destes dados físicos, deve ser feita referência às definições e métodos de análise de dados pela ASTM. Os seguintes métodos de ensaio relativos à colofónia estão descritos na tabela 6 [1].

**Tabela 6:** Métodos de ensaio referentes à colofónia [1]

<b>D 269 – 92</b>	Matéria Insolúvel na Colofónia
<b>D 464 – 92</b>	Nº Saponificação de Colofónia
<b>D 465 – 92</b>	Nº Ácido da Colofónia
<b>D 509 – 70</b>	Amostragem e Classificação na Colofónia
<b>D 889 – 58</b>	Óleo Volátil na Colofónia
<b>D 1063 – 51</b>	Cinza na Colofónia
<b>D 1064 – 58</b>	Ferro na Colofónia
<b>D 1065 - 92</b>	Insaponificável na resina
<b>D 3008 – 90</b>	Ácidos resínicos na Colofónia por GC-MS
<b>E 28 - 92</b>	Ponto de Amolecimento

## 1.6. Produção Mundial, Comércio e Perspectivas

- Républica Popular da China

Vastas áreas de pinheiros nativos que crescem no sul do país formam a base da indústria da colofónia chinesa. As principais espécies utilizadas são *Pinus massoniana* (principalmente em povoamentos naturais), *Pinus Yunnanensis*, *Pinus latteri*, *Pinus tabulaeformis* e *Pinus kesiya*.

Apesar da diminuição na produção devido às cheias em 1994, a produção anual de colofónia nos anos anteriores terá ultrapassado as 500000 toneladas, obtendo-se cerca de 400 mil toneladas de colofónia após o processamento. Uma fonte chinesa (Shen Zhaobang, 1994) indica que em 1993, foram produzidas 430000 toneladas de colofónia, das quais 60% (277000 toneladas) foram exportadas. Da resina que permanece para consumo local, cerca de 44% é utilizado no fabrico de sabão e cerca de 35% para o papel [1].

- Indonésia ( e outros países do sudeste asiático):

Embora a Indonésia tenha produzido durante muitos anos colofónia e terbentina, foi há relativamente pouco tempo que surgiu em força no comércio mundial. Praticamente toda a produção de resina em bruto é baseada em extensas áreas de plantação da espécie *Pinus meskussi*. No ano de 1980 foram introduzidos métodos de processamento modernos para substituir as unidades mais antigas. Posteriormente a produção cresceu de 16000 toneladas de resina bruta para 70000 toneladas de resina e de seguida subiu para 100000 toneladas. Apesar da maior parte da colofónia e da terbentina produzida na Indonésia ser exportada, um aumento da produção de ambos está a ser consumida no mercado interno. Os números do comércio indonésio são estatisticamente mais baixos. A produção de derivados a jusante é susceptível de atrair cada vez mais atenção nos próximos anos [1].

- América do Sul

O Brasil é o maior produtor de colofónia na América do Sul. Áreas consideráveis, cerca de 1,5 milhões de hectares, são plantadas com pinheiros de espécies diferentes. O *Pinus caribaea* e o *Pinus oocarpa* tropical são cultivados no norte, enquanto as espécies *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* são cultivados no sul. A drenagem do pinheiro em larga escala começou no final de 1970 e a produção de resina em bruto aumentou de forma constante para cerca de 65000 toneladas no final de 1980. A produção decresceu por volta de 1991/92 mas em 1995 a produção voltou a subir para cerca de 60000-65000 toneladas. A maioria dos produtos são consumidos internamente, mas algumas quantidades significativas são exportadas (135000 toneladas de colofónia e 3000 toneladas de terbentina) [1].

- Portugal (e Europa em geral)

As temperaturas quentes de verão, favoráveis ao fluxo de resina, e as grandes áreas de pinheiro existente em Portugal fizeram do país um grande produtor de colofónia. Entre 1978 e 1987 a produção de resina em bruto era em média de 110000 toneladas por ano. Em 1992 a produção decaiu para cerca de 30000 toneladas. A maioria da resina produzida em Portugal ainda é exportada, apesar de um valor significativo ser usado internamente [1].

**Tabela 7:** Produção e exportação estimada (toneladas) [1]

País	Ano	Produção			Exportação	
		Resina	Colofónia	Terbentina	Colofónia	Terbentina
<b>China</b>	1993	570000	430000	50000	277000	5500
<b>Indonésia</b>	1993	100000	69000	12000	46000	7500
<b>Rússia</b>	1992	90000	65000	9000	1000	500
<b>Brasil</b>	1993	65000	45000	8000	13000	3000
<b>Portugal</b>	1992	30000	22000	5000	26000	6000
<b>Índia</b>	1994	30000	21000	4000	-	-
<b>Argentina</b>	1993	30000	21000	4000	10000	2000
<b>México</b>	1991	30000	22000	4000	5000	?
<b>Honduras</b>	1992	8000	6000	1000	5000	500
<b>Venezuela</b>	1993	7000	5000	800	-	-
<b>Grécia</b>	1993	6000	4000	600	-	-
<b>África do Sul</b>	1993	2000	1500	200	-	-
<b>Vietnam</b>	1990	2000	1500	200	1000	-
<b>Outros</b>	-	6000	4000	600	-	-
<b>Total</b>	-	976000	717000	99400	384000	25000

Os dados apresentados na tabela 8 são referentes a 1994/1995 e mostram a comparação das grandes quantidades de resina e consequentemente de colofónia e terbentina que era produzida e exportada nos diferentes países.

Além destes países, existem outros tais como o México e a Índia que produzem quantidades de resina idênticas às de Portugal. Mas em comparação

com este, o México e a Índia não são grandes exportadores, sendo a maior parte da resina produzida utilizada para consumo interno.

Actualmente, o principal produtor de colofónia é a China, cuja matéria-prima é maioritariamente obtida através de terbentina de *Pinus massoniana* e *Pinus elliottii*. Os Estados Unidos também são muito bons produtores de colofónia através de terbentina de *Pinus palustris* e *Pinus taeda*. Já no México, a maior parte da resina é derivada de *Pinus oocarpa*, *Pinus leiophylla*, *Pinus devoniana* e *Pinus montezumae*.

Em Portugal, a produção de colofónia já alcançou em tempos valores de 14000 toneladas por ano, sendo que nos últimos anos a produção rondou as 4500 toneladas por ano. O tipo de colofónia produzida em Portugal é considerado como sendo uma das colofónias de melhores propriedades. Em Portugal, a produção de colofónia é de elevado potencial já que 33% das árvores plantadas nas florestas portuguesas são pinheiros. Do ponto de vista do desenvolvimento sustentável, a exploração da resina de pinheiro em Portugal poderá conduzir a bons resultados dada a sua elevada qualidade comparando com outros produtores mundiais [10, 11].

### 1.7. Aplicações da Colofónia

A colofónia e seus constituintes têm sido alvo de estudos para inúmeras aplicações industriais e farmacológicas, entre outras.

O ácido dehidroabiético, como outros “abietatos”, é um ácido diterpeno importante no sistema de defesa das coníferas contra potenciais herbívoros e patogénicos. O ácido dehidroabiético e os seus derivados apresentam um amplo espectro de acção biológica: actividades anti-úlceras, anti-microbiana, ansiolítica, anti-viral, anti-tumoral e citotóxica [7].

A colofónia, mais especificamente os produtos da sua oxidação [8], actuam como um sensibilizante da pele bem conhecido mas também está entre as causas mais comuns de asma ocupacional. A complexa composição química tem impedido o progresso da identificação específica dos alérgenos respiratórios que contém. Em 1997, Foulds e colaboradores desenvolveram um método de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC do inglês *High Performance Liquid*

*Chromatography*) com a finalidade de isolar todos os componentes de colofónia possíveis. A estrutura dos componentes dermatologicamente mais activos, produtos da oxidação do dehidroabiético [3], foi determinada/caracterizada por técnicas como espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear e infravermelho. O método de HPLC desenvolvido permite ainda a identificação da colofónia em produtos comerciais, proporcionando assim uma valiosa ferramenta para determinação da causa alergénica por contacto com a colofónia [3].

Ao nível farmacológico a colofónia “pura” e polímeros derivados da colofónia têm diversas aplicações na distribuição de fármacos (*drug delivery*), conseguindo perfis de libertação prolongada e controlada. Os ácidos resínicos, tais como o ácido abiético e o pimárico, têm sido utilizados como matérias-primas, a fim de se obter novos polímeros baseados em materiais renováveis. A utilização de polímeros naturais e seus derivados semi-sintéticos na entrega de fármacos, continua a ser uma área de investigação activa, apesar do aparecimento de polímeros sintéticos, porque os polímeros naturais são de baixo custo, facilmente disponíveis, com grande capacidade de modificação química, potencialmente degradáveis e compatíveis devido à sua origem. Um biopolímero, a colofónia, e também os seus derivados têm sido avaliados como materiais micro-encapsulantes e como agentes de ligação anidros em comprimidos. Os mais proeminentes incluem o ácido abiético com ligações duplas conjugadas e pimárico com ligações duplas não conjugadas. As moléculas do ácido de colofónia possuem dois centros quimicamente reactivos, as ligações duplas e o seu grupo carboxilo. Sendo de origem natural, é expectável que a colofónia e seus derivados sejam biodegradáveis e biocompatíveis. Por exemplo, o éster de colofónia-glicerol é biodegradável *in vivo* [12].

De entre as aplicações industriais da colofónia destaca-se a utilização em adesivos. Todos os adesivos contêm polímeros, mas também podem conter aditivos, que são geralmente em menor quantidade, mas que podem ser essenciais, dependendo da aplicação final do adesivo. Tais aditivos podem actuar como estabilizadores, promotores de adesão, agentes de enchimento e ainda agentes de viscosidade.

O éster de pentaeritritol da colofónia é usado como agente de adesividade em adesivos sensíveis a pressão e em adesivos com elevados pontos de fusão, sendo utilizado em grandes quantidades, muitas vezes igualando o peso do polímero constituinte do adesivo em algumas formulações. O *PERE* (do inglês *pentaerythritol rosin ester*) é preparado a partir de pentaeritritol e ácido de colofónia. Outras substâncias derivadas da colofónia que são utilizadas como agentes de adesividade incluem resinas de terpenos, que são oligómeros de  $\alpha$  e  $\beta$  pinenos, os ésteres de glicerol, de ácidos de colofónia e dos ácidos de colofónia hidrogenada.

Nas últimas décadas, as técnicas de análise de superfície por espectroscopia de foto-electrões de raio-X e por espectroscopia de massa estática de iões secundários modernizaram a análise química das camadas superficiais envolvidas na ligação adesiva [13].

Algumas das aplicações requerem uma combinação de reacções para obter o produto com a qualidade desejada. Por exemplo, na esterificação com polióis, as reacções de desproporção e de isomerização ocorrem em conjunto, levando a ésteres de ácidos de colofónia estáveis à oxidação e deste modo, de uma cor muito clara, uma das propriedades desejadas da colofónia e seus produtos. A colofónia desproporcionada tem uma boa resistência à oxidação, baixa fragilidade, alta estabilidade térmica e cor clara, e mantém um ponto de amolecimento elevado, mesmo mais elevado do que a colofónia “inicial” em virtude da eliminação dos óleos de terpentina durante a desproporção entre 200 e 240°C.

Este tipo de colofónia tem algumas aplicações importantes na indústria polimérica, onde a presença de ácido abiético não é adequado, uma vez que este actua como inibidor (valores abaixo de 0,5% de ácido abiético são procurados) e percentagens muito elevadas de ácido dehidroabiético são desejadas (65% ou mais). Estas aplicações incluem a utilização como emulsionante na produção de borracha de estireno-butadieno, resina *ABS* (do inglês *Acrylonitrile Butadiene Styrene*) e borracha de cloropreno [14,15].

Novos campos onde as aplicações estão a ser desenvolvidas incluem a síntese de tensioactivos iónicos, aplicações na indústria de revestimento em tintas anti-incrustantes e na síntese de novos polímeros [7].

Ao longo do texto podemos ver que a colofónia está presente em diversas aplicações e estudos. É deste modo que a estrutura e as características do amido ácido de colofónia catalisada por lipase são estudadas, em termos de aplicação ao nível da alimentação e ao nível de materiais biomédicos.

A esterificação do amido de mandioca com colofónia utilizado na lipase como catalisador dá lugar à destruição quase completa da morfologia e cristalinidade do amido de mandioca. O amido de ácido de colofónia exibe maior viscosidade, bem como propriedades emulsificantes, enquanto o amido esterificado diminuiu o seu poder de crescimento, a sua solubilidade e a sua transparência na água [16].

As novas resinas de éster vinílico com base em colofónia são a formulação para uma outra aplicação, desta vez em revestimentos. A colofónia é conhecida por ter excelente solubilidade e compatibilidade com uma variedade de outras resinas sintéticas. Isto acontece porque os ácidos de resina têm um esqueleto hidrofóbico em combinação com os grupos carboxilo hidrofílicos, constituindo uma vantagem para muitas aplicações de revestimento. Por exemplo, quando a colofónia ou o seu aducto foi incorporada em vernizes para aplicação de revestimento, foram relatados efeitos de secagem rápida e melhor resistência química [17].

## 1.8. Métodos de Caracterização

Como já foi referido são vários os critérios que determinam a qualidade da colofónia e a sua aceitabilidade para diferentes tipos de aplicações.

**Tabela 8:** Métodos de caracterização qualitativos e quantitativos

Qualitativos	Quantitativos
TLC	GC
IV	GC-MS
DSC	LC
TGA	LC-ESI-MS
	RMN
-	HPLC
-	MALDI-TOF-MS



Na literatura [18-24], descrevem-se algumas metodologias de caracterização de resinas, tais como as ilustradas na tabela 8.

As metodologias aplicadas são muito diversas, desde métodos qualitativos simples como o TLC (do inglês *Thin Layer Chromatography*) a metodologias mais complexas que requerem a utilização de equipamento especializado como o MALDI-TOF-MS (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*).

A análise de ácidos de resina é normalmente levada a cabo por cromatografia em fase gasosa (GC) após a conversão dos ácidos de resina para os seus ésteres metílicos [3].

### 1.9. Determinação da Concentração de Ácido Abiético numa resina

O ácido abiético é o componente principal das resinas em estudo, tornando-se relevante a sua análise quantitativa. Nesta dissertação apresentamos uma metodologia físico-química para a determinação da concentração do ácido abiético numa resina e um estudo preliminar da validação do método analítico. O método seleccionado para a determinação quantitativa do ácido abiético foi a análise cromatográfica por GC-MS.

A análise cromatográfica quantitativa é realizada através de uma calibração externa com um conjunto de soluções padrão de concentração próxima à do analito na amostra. As fontes mais importantes de erros analíticos através do uso deste método são as incertezas no volume da amostra e na preparação dos padrões, além de problemas durante o processo de injeção. A reprodutibilidade do volume de injeção pode ser comprometida uma vez que se tratam de injeções manuais de pequenas quantidades (neste caso 1  $\mu$ L) podendo o erro relativo ser elevado. Para minimizar as incertezas introduzidas na injeção da amostra usou-se o método do padrão interno (PI).

O PI deve ter preferencialmente as seguintes características: não estar presente na amostra, ser disponível em elevado grau de pureza, ser bem resolvido dos outros picos, ser estruturalmente semelhante ao analito, ou possuir os mesmos grupos químicos do analito.

A quantidade de uma substância medida cuidadosamente, que actua como padrão interno, é introduzida em cada amostra, e a razão entre as áreas do pico do analito e do padrão interno funcionam como parâmetro analítico.

O padrão interno seleccionado para este estudo foi o colesterol.

Foi também objectivo deste trabalho que o método de análise seleccionado seja fiável e que os resultados dos ensaios sejam consistentes.

O grau de exigibilidade requerido para o método torna necessário realizar alguns estudos de validação. Estes foram realizados de acordo com as normas internacionais e do sistema de qualidade e boas práticas de laboratório [25] para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.

A validação deve ser um processo contínuo revelando-se bastante longo e demorado uma vez que requer não só uma quantidade considerável de análises como também implica um elaborado processo de tratamento de dados obrigando a um tratamento estatístico rigoroso [26-29].

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo do conhecimento da selectividade e especificidade, da linearidade, da gama de trabalho/linearidade, da sensibilidade, dos limiares analíticos (detecção/quantificação), e da precisão e exactidão.

Para garantir que um método analítico gera informação viável sobre uma amostra, este deve seguir um processo de avaliação sistemática. Trata-se pois, de definir requisitos do método e confirmar que este possui capacidade de desempenho consistente com o que se pretende da sua aplicação [30]. Os métodos analíticos para a quantificação de um composto presente numa amostra desempenham um papel fundamental na avaliação e interpretação de resultados. A fiabilidade de um método analítico de quantificação de uma substância implica a determinação dos seguintes parâmetros essenciais: selectividade e especificidade, linearidade, validação da gama de trabalho, sensibilidade, limiares analíticos (LD e LQ) e a precisão e a exactidão.

Neste trabalho procedeu-se a um estudo preliminar da validação do método para a quantificação de ácido abiético em amostras de colofónia.

### 1.9.1. Selectividade e Especificidade

Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico são importantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente [31].

A especificidade e a selectividade estão relacionadas com a capacidade de detecção. Por selectividade entende-se a capacidade de um método identificar e distinguir um analito, em particular numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes com auxílio de padrão para comparar com o pico de concentração de conhecida e posterior identificação da mesma por espectrometria de massa.

Por sua vez, a especificidade é a discriminação do analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito. Para métodos cromatográficos a especificidade é demonstrada através do próprio cromatograma que deve apresentar resolução entre os sinais da substância em estudo e dos restantes compostos presentes na mistura, com uma coluna cromatográfica adequada ao tipo de compostos em estudo.

Contudo, numa fase mais avançada de validação de métodos é necessário avaliar as interferências através da realização de um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e selectivo) quando na prática e após a realização de testes de recuperação (cálculo da percentagem de recuperação), se verificar que as taxas de recuperação são entre 80 e 100% [26, 32]. Porém, caberá ao laboratório que realiza os ensaios de recuperação, ter critérios de aceitação relativos às taxas de recuperação conseguidas, baseados em dados e factos credíveis. A percentagem de recuperação obtém-se por divisão do teor medido do componente adicionado, pelo valor efectivamente adicionado, e multiplicado por 100. Qualquer valor obtido compreendido no intervalo mencionado fornece a informação de que, tanto o procedimento, quanto a matriz, não influenciam de modo significativo na

detecção do analito, demonstrando que o método é capaz de identificar todo o analito presente [26, 27].

## **1.9.2. Curva de calibração e linearidade**

Nos processos analíticos que necessitam de ser calibrados, as observações ou resultados analíticos só representam o resultado de uma medição física que será posteriormente convertida para o resultado analítico utilizando os dados obtidos empiricamente através de calibração [33, 34]. A linearidade do método pode ser demonstrada através do estudo estatístico dos parâmetros da curva de calibração [35, 36].

### *1.9.2.1. Testes de Linearidade*

Para a verificação da linearidade deve-se trabalhar através de funções de calibração de primeiro grau. As funções de calibração de segunda ordem só devem ser usadas em exceções justificadas.

#### **i. Teste Visual**

A linearidade pode ser demonstrada pelo exame visual que relaciona os sinais obtidos na análise e a concentração do analito.

Em geral, é estabelecido um critério de aceitação/rejeição da recta de calibração, um coeficiente de correlação para uma função de primeira ordem do tipo  $y = a + bx$ , superior a um determinado valor. Este valor depende do histórico e da natureza de cada determinação. Estabeleceu-se que no estudo em causa o coeficiente de correlação (R) deve ser superior a 0,95.

#### **ii. Teste de Mandel**

O teste de Mandel avalia a melhoria introduzida pela equação quadrática, no ajustamento dos pontos experimentais [35, 36]. A função de calibração de primeira ordem é dada por  $y = a + bx$ , onde  $a$  é o declive,  $b$  a ordenada na origem e  $R$  o coeficiente de correlação.

Com desvio padrão residual de ajuste,  $s_{y1}$

$$s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} \quad \text{(Equação 1)}$$

e a função de calibração de segunda ordem é dada por,  $y = a + bx + cx^2$ .

Com desvio padrão residual de ajuste,  $s_{y2}$

$$s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}} \quad \text{(Equação 2)}$$

O valor de teste TV é determinado da seguinte forma:

$$TV = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad \text{(Equação 3)}$$

onde,

$$DS^2 = (N - 2) * s_{y1}^2 - (N - 3) * s_{y2}^2, \text{ com graus de liberdade } f_1 = 1 \quad \text{(Equação 4)}$$

A diferença das variâncias  $DS^2$  é calculada através do desvio padrão residual,  $s_{y1}$ , para a função de calibração de primeira ordem, e  $s_{y2}$ , para a função de calibração de segunda ordem.

O valor obtido para TV é posteriormente comparado com o valor tabelado na distribuição de Fisher ( $f_1 = 1$ ;  $f_2 = N-3$ ;  $P = 99\%$ ).

Se  $TV \leq F$ , não há melhoria significativa com a introdução da equação quadrática. Pelo que, se assume que o processo de calibração segue uma função linear.

Se  $TV > F$ , os passos individuais do processo analítico devem ser verificados em primeiro lugar e melhorados, se possível. Se após este passo a linearidade não for obtida, de seguida é feito um estreitamento do intervalo com intuito de manter a linearidade. O último recurso é a avaliação futura dos dados medidos através da função de calibração de segunda ordem.

### iii. Análise de resíduos

A análise de residuais constitui outra possibilidade para testar se a aproximação funcional escolhida do modelo de calibração descreve adequadamente os resultados medidos na análise residual. O  $d_i$  residual é a distância vertical das observações a partir da curva de regressão.

$$d_i = y_i - \hat{y}_i, \text{ para } i = 1, \dots, n \quad (\text{Equação 5})$$

onde  $y_i$  identifica a observação e  $\hat{y}_i$  o valor estimado a partir da função de calibração.

Os resíduos ( $d_i$ ) são distribuídos normalmente se a abordagem do modelo escolhido estiver correcta. Se os resíduos mostram uma tendência, então a aproximação de regressão subjacente deve ser verificada.

- Teste de *Outliers* para calibração linear

Pontos de influência, que possam ser ou não valores aberrantes (do inglês *outlier*), podem ter um efeito significativo no modelo de regressão. A análise residual também pode ser utilizada para determinar valores extremos durante a calibração. Para esta finalidade, a curva de calibração com o desvio padrão residual,  $s_{yA1}$  deve ser calculada utilizando todos os pares de dados.

A pré-selecção dos potenciais *outliers* pode ser feita matematicamente através da determinação dos resíduos  $(y_i - \hat{y}_i)$  e sua representação gráfica. Cada par de dados com grande afastamento da recta de calibração é notavelmente um residual sendo um potencial *outlier*.

Após a eliminação do par suspeito (x, y) a partir dos dados escolhidos, uma nova recta de calibração é calculada com a distribuição residual  $s_{yA2}$ . Ou um teste F ou uma t-teste pode ser utilizados para verificação. Tanto um método como outro dão resultados idênticos.

As distribuições residuais  $s_{yA1}$  e  $s_{yA2}$  das duas rectas são verificadas quanto à sua diferença significativa. O valor de teste (TV) é calculado através da equação 6.

$$TV = \frac{(N_{A1} - 2) \cdot s_{yA1}^2 - (N_{A2} - 2) \cdot s_{yA2}^2}{s_{yA2}^2} \quad \text{(Equação 6)}$$

onde  $N_{A1}$  é o número de pontos da curva de calibração e  $N_{A2}$  é o número de pontos da curva de calibração eliminando o valor suspeito.

O valor calculado (TV) é comparado com o valor de tabelado (F) nas seguintes condições,  $f_1 = 1$ ,  $f_2 = N_{A2} - 2$ ,  $P = 95\%$ .

Se  $TV < F$ , não existem outliers e os valores que tinham sido eliminados podem voltar a ser adicionados aos dados.

### 1.9.3. Validação da Gama de Trabalho

#### 1.9.3.1 Teste de homogeneidade de variâncias

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado duma curva de calibração, deve-se avaliar a gama de concentrações dos padrões utilizados na curva [37].

O teste da homogeneidade das variâncias é a comparação estatística da variância do padrão mais concentrado ( $s_N^2$ ) com a do padrão menos concentrado ( $s_1^2$ ) da curva (visto que estes normalmente apresentam uma maior variância).

Com o objectivo de verificar a homogeneidade das variâncias, as  $n=10$  amostras de cada um dos padrões mais baixos ( $x_1$ ) e mais altos ( $x_N$ ), na gama de concentrações preliminar são analisados separadamente.

O  $\bar{y}_1$  e  $\bar{y}_N$  e as variâncias  $s_1^2$  e  $s_N^2$  são calculadas para ambos os conjuntos de dados, deste modo:

$$s_i^2 = \frac{\sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}, \text{ com } i = 1 \text{ e } i = N, \quad \text{(Equação 7)}$$

As variâncias de ambas as séries de medições são verificadas quanto a homogeneidade utilizando um teste F.

$$TV = \frac{s_N^2}{s_1^2} \quad \text{(Equação 8)}$$

O valor calculado (TV) é comparado com o valor tabelado na distribuição de Fisher. A decisão estatística é a seguinte:

Se o teste F mostra uma diferença significativa entre as variâncias, isto é, se  $TV \leq F$ , a diferença entre as variâncias não é significativa. se  $TV > F$  a diferença entre as variância é significativa e pode-se escolher uma faixa de concentrações mais estreita e repetir a verificação da homogeneidade das variâncias.

#### 1.9.4. Sensibilidade

A sensibilidade analítica descreve a capacidade de um método experimental diferenciar entre os valores relacionados. Ela indica em que grau um valor muda dependendo do sinal do sistema de medição e podem ser quantificados usando a inclinação da curva de calibração.

De acordo com os guias [26, 27] deve-se estabelecer um intervalo de confiança para a aceitação do declive da recta. Esse intervalo é definido pelo valor do declive  $\pm 3*s_y$ .

#### 1.9.5. Limiares Analíticos

##### 1.9.5.1. Limite de Detecção

Muitos problemas em química analítica são problemas de detecção e determinação de elementos ou compostos em pequenas quantidades de amostra.

O limite de detecção de um processo analítico onde o analista deve escolher o processo com maior sensibilidade e precisão possível, ou seja, aquele com menor limite de detecção [33, 38].

Pela bibliografia/literatura pode-se verificar que ao longo do tempo o cálculo do limite de detecção tem sido discutido exaustivamente. No entanto, ainda não se conseguiu padronizar o mesmo não existindo consenso.

Pela definição da IUPAC, “o limite de detecção é expresso como a concentração ou a quantidade, e derivado a partir da menor medida, que pode ser detectada com razoável certeza para um dado procedimento analítico” [39].



A definição mais aceita para o limite de detecção é a que envolve a concentração ou a massa mínima de analito que pode ser detectada num nível conhecido confiável. Este limite depende da razão entre o sinal do analito e o sinal do branco [40], ou seja, é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar do sinal do ruído.

Existem três formas para calcular o limite de detecção tendo em conta o grau de confiabilidade estatística necessária. Pode-se estimar o LD através do método da relação sinal-ruído (“branco”), pelo método da curva analítica baseado nos seus parâmetros ou pelo método visual.

**i. Determinação do LD através do valor da leitura do branco da amostra**

Para determinar o valor do limite de detecção através do “branco” recorre-se ao método IUPAC (do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry):

$$LD = k \frac{S_B}{S} \quad (\text{Equação 9})$$

onde o  $k=3$ , que nos dá um nível de confiança na prática de 90% a 99,7% dependendo do sinal do branco da amostra.

No nosso caso, determinar o valor do “branco” torna-se mais complicado uma vez que não temos nenhuma amostra que não possua analito (ácido abiético).

**ii. Determinação do LD pelo método da curva analítica**

Através do traçado da recta de calibração é possível calcular o intervalo de confiança da mesma, o limite inferior e superior.

Para uma maior confiabilidade estatística utiliza-se este método uma vez que este leva em consideração o intervalo de confiança de regressão.

O LD é definido, neste caso, como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida com 99% ou 95% de confiança.

A intercepção do limite superior do intervalo de confiança e a sua projecção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança comprovado estatisticamente.

$$LD = \left(2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) * \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{(Equação 10)}$$

sendo,

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{(Equação 11)}$$

onde,

$a_0$  é a ordenada na origem,  $a_1$  é o declive,  $x_i$  é a concentração das amostras,  $\bar{x}$  é o valor médio das concentrações,  $y$  é a área,  $s_y$  é o desvio padrão residual e  $N$  é o número total de observações,  $s_y$  é o desvio padrão residual.

### iii. Determinação do LD pelo Teste Visual

Através do método visual realiza-se a análise das amostras contendo baixas concentrações conhecidas da espécie de interesse. Considera-se o LD como sendo a menor concentração que pode ser detectada e que seja distinta do sinal analítico do ruído [41].

#### 1.9.5.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação de um processo analítico básico é definido como a menor concentração de uma substância que pode ser determinada usando um dado nível de precisão analítica, expressos como o intervalo de confiança relativo. O valor do limite de quantificação é, por conseguinte, dependente do maior erro aleatório que pode ser tolerado entre os resultados.

O limite de quantificação foi determinado experimentalmente como a menor concentração de pico do padrão mais baixo da curva, neste caso, 0,2 mg/mL [42].

O limite de quantificação é calculado através da análise de pelo menos 10 medições do padrão mais baixo da curva, neste caso, 0,2 mg/mL. Este limite depende da média e do desvio padrão do valor experimental ( $x_i$ ) calculado através da equação da recta  $y = ax + b$ . A estes valores estão associados um erro relativo (ER) e um coeficiente de variação. Considerou-se que o LQ seria aceite quando o ER < 10%.

### 1.9.6. Precisão e Exactidão

A precisão e a exactidão são dois pontos muito utilizados e importantes para quantificar a confiabilidade do método utilizado. A exactidão descreve o desvio de parâmetros estimados em relação ao valor verdadeiro enquanto a precisão se refere ao grau de concordância entre os parâmetros individuais [26, 27].

#### 1.9.6.1. Precisão

Precisão é um termo qualitativo para a extensão da aproximação dos resultados analíticos ao valor de referência, que pode ser tanto o valor verdadeiro, real ou aceite dependendo da definição ou acordo. Ou seja, este parâmetro analítico avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos em relação à mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. Geralmente a precisão varia com a gama de trabalho (concentrações). Torna-se mais realista estudar a precisão sobre as amostras de modo a minimizar efeitos de matriz.

A precisão é avaliada em três parâmetros: a repetibilidade e a reprodutibilidade, que são duas medidas de avaliação da dispersão que apresentam os extremos da variabilidade de um método sendo a repetibilidade uma medida mínima e a reprodutibilidade uma medida da variabilidade máxima dos resultados. Entre estas duas medidas existe o outro parâmetro, a precisão intermédia [26, 27, 31, 33].

**i. Repetibilidade**

A repetibilidade é um termo qualitativo para o nível de aproximação recíproca dos resultados analíticos em condições de repetição.

Para se estar em condições de repetibilidade temos de ter em atenção as condições para a obtenção de resultados analíticos independentes com o uso repetido de um processo analítico ou método no mesmo objecto, pelo mesmo observador em pequenos intervalos de tempo com o mesmo equipamento no mesmo laboratório [43, 44].

**ii. Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade refere-se à precisão do método efectuado em condições de ensaio diferentes sobre a mesma amostra sendo definida como a aproximação/concordância entre resultados das medições da mesma medida efectuada mas fazendo variar pelo menos uma das condições de medição: diferentes laboratórios, com diferentes analistas, com diferentes equipamentos, ou em dias diferentes [26-28].

**iii. Precisão Intermédia**

A precisão intermédia diz respeito à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições de análise que variam, como, diferentes analistas, diferentes equipamentos, em dias diferentes. Este parâmetro de precisão é a que mais representa a variabilidade dos resultados num laboratório e também a mais aconselhável [43, 44].

*1.9.6.2. Exactidão*

A exactidão é definida como a aproximação entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da medida. A exactidão de um método analítico pode ser determinada através da participação em ensaios interlaboratoriais, pelo estudo de materiais de referência certificados, através de ensaios fortificados ou testes de recuperação ou por comparação com métodos de referência.

**Capítulo II**  
*Resultados e Discussão*

---



## 2. Resultados e Discussão

### 2.1. Caracterização das Amostras de Colofónia

A caracterização de colofónia, sendo uma mistura complexa e variável de diversos ácidos resínicos, é uma tarefa complexa.

É amplamente reconhecido que as técnicas cromatográficas hífenadas com espectrometria de massa são ferramentas de eleição para caracterização de misturas complexas pois permitem não só separar e quantificar os componentes da mistura, como auxiliam na sua identificação. De entre as diferentes técnicas hífenadas, LC-MS, HPLC-MS ou GC-MS esta última é a mais usual e menos dispendiosa, pelo que é a mais comum em laboratório de análise particularmente nos da indústria, que habitualmente apenas contam com um GC. Contudo, a análise de colofónia através desta técnicas é dificultada porque, sendo os ácidos resínicos e os seus derivados compostos que apresentam uma elevada polaridade e baixa volatilidade, não é possível realizar a análise direta por cromatografia de gases (GC). Assim, ou se recorre a equipamentos menos usuais e mais dispendiosos ou se modificam as propriedades dos ácidos resínicos de modo a poder realizar a análise com os sistemas cromatográficos mais comuns num laboratório de análise.

A derivatização de ácidos resínicos permite a modificação dos grupos funcionais da molécula aumentando a sua volatilidade, diminuindo a polaridade e melhorando a sua estabilidade nas condições requeridas durante a análise, a redução da absorção do analito no cromatógrafo de gases melhora a resposta do detector e aumenta a eficiência na separação dos picos cromatográficos. Assim uma apropriada derivatização permitirá a sua análise por GC-MS, uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis actualmente.

Para a preparação de derivados de ácidos para posterior análise cromatográfica pode-se optar por diversas reacções, tal como esterificação catalisada por ácido, metilação com diazometano, preparação de amidas por reacção com alquilformamidas ou preparação de ésteres de trimetilsililo, entre outros.

A escolha do método de derivatização não é trivial, deve ter em consideração em primeiro lugar a massa do produto derivatizado, que não deve

exceder os limites de detecção do GC-MS disponível (550 D), e sobretudo as condições requeridas para que a reacção seja completa, isto é, que os produtos sejam obtidos com o maior rendimento possível, e a técnica não deve ser selectiva em relação aos componentes presentes numa mistura, assegurando a derivatização de todos eles, e ainda temos de ter atenção que o processo de derivatização não deve modificar a composição da amostra.

Para poder certificar que todos estes requisitos são verificados é necessário conhecer a composição da amostra antes desta ser derivatizada e analisada, o que só pode ser realizado recorrendo a uma metodologia de análise que não requeira derivatização.

### 2.1.1. RMN

A metodologia escolhida foi a análise por ressonância magnética nuclear de protão (RMN-<sup>1</sup>H). Na Figura 1 apresenta-se o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da amostra de resina R2.

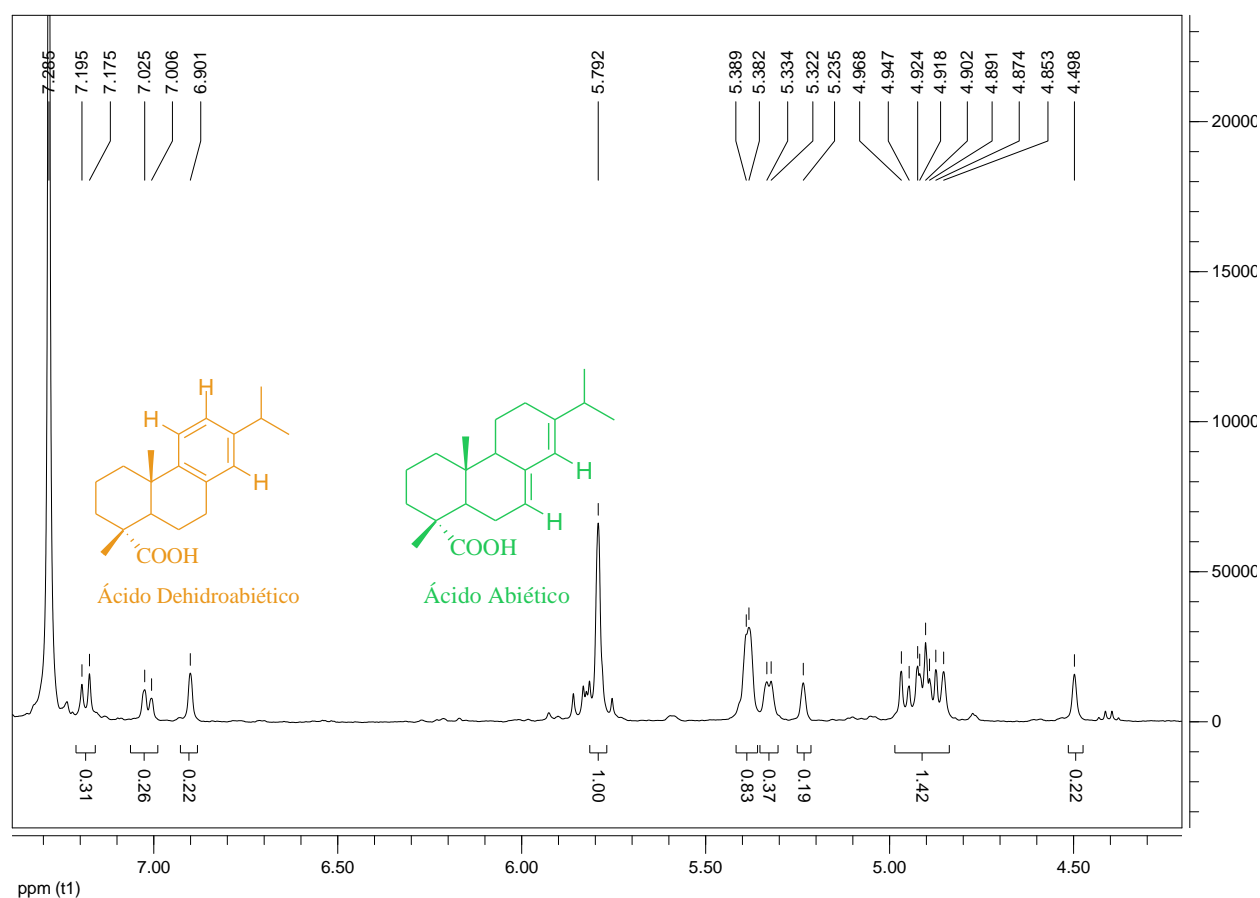


Figura 1: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da resina R2



No espectro, na região entre 0-3 ppm, apresentam-se os picos correspondentes aos hidrogénios em carbonos  $sp^3$  de todos os ácidos resínicos presentes na amostra, de onde não é possível realizar nenhuma atribuição específica. A região compreendida entre 4 - 7,3 ppm é muito mais informativa pois corresponde aos hidrogénios em carbonos com hibridização  $sp^2$  que são menos numerosos e mais específicos. O duplete em 7,19 ppm com  $J = 0,3$  Hz, o duplete em 7,05 ppm com  $J = 0,3$  Hz e o singuleto em 6,91 ppm, integrando cada um deles a um hidrogénio são atribuíveis aos 3 hidrogénios no anel aromático do ácido dehidroabiético, o único ácido resínico aromático. Os singuletos em 5,79 e 5,39 ppm são atribuídos aos H do ácido abiético já que é o único que apresenta hidrogénios isolados na estrutura e que se encontra em maior quantidade e portanto com maior integração.

Todas as amostras de resina foram analisadas por esta metodologia apresentando a relação de ácido abiético/dehidroabiético que se apresenta na tabela seguinte, tabela 9.

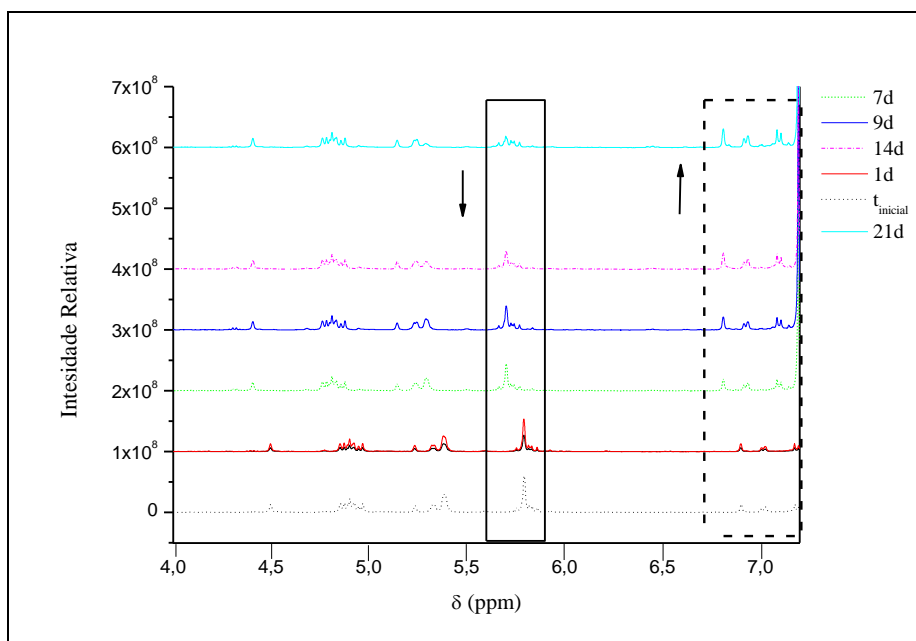
**Tabela 9:** Relação de ácido abiético/dehidroabiético das resinas calculada por RMN- $^1H$

Resina	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R12	R13	Abiético (Aldrich)
<i>Abiético</i>													
<i>Dehidro</i>	11,11	4,55	8,33	4,76	14,29	8,33	6,67	16,67	7,69	5,56	7,14	6,67	16,67

A influência da exposição ao ar, à temperatura ambiente, na composição da resina foi avaliada por RMN- $^1H$  comparando a modificação da composição ao longo de 21 dias de duas amostras da mesma resina, a amostra 1 foi mantida fechada, no escuro a 0°C e a amostra 2 foi exposta ao ar, à luz e à temperatura ambiente, ambas em solução de  $CDCl_3$ .

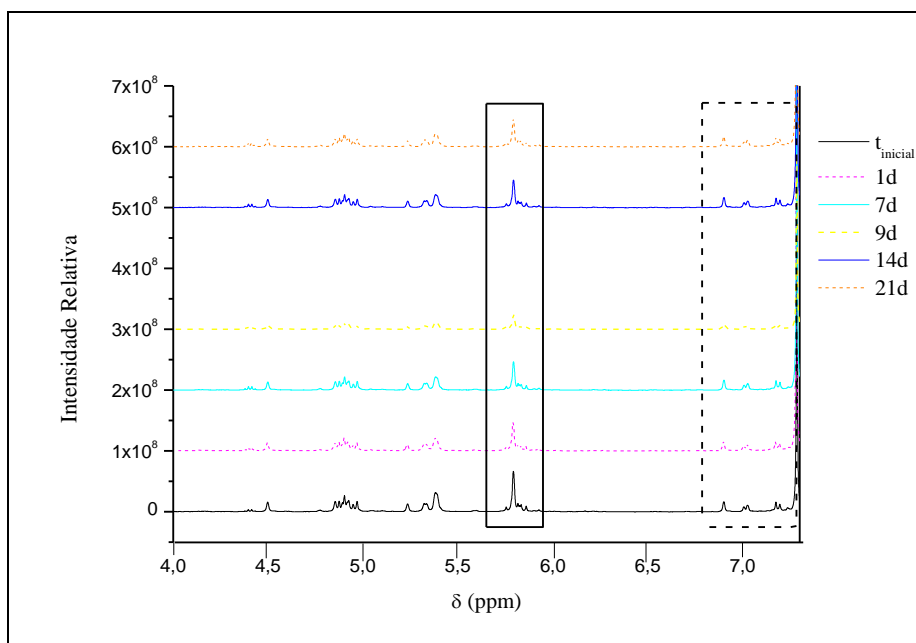
Na figura 2 apresenta-se o espectro de RMN da resina exposta ao ar, à luz e à temperatura ambiente. A 7 ppm apresenta-se a zona do ácido dehidroabiético, e entre 5,5 - 6 ppm é onde se apresenta a zona do ácido abiético. No gráfico podemos observar que à medida que aumenta o tempo de exposição aos factores já mencionados a presença de ácido abiético na resina diminui na mesma proporção que o ácido dehidroabiético aumenta. Isto é, em exposição ao ar a resina degrada-se, ou seja, os seus ácidos resínicos sofrem alterações,

observando-se a transformação de ácido abiético em dehidroabiético à temperatura ambiente.



**Figura 2:** Espectro de RMN da resina à  $T_{\text{ambiente}}$  durante 21 dias

Na figura 3 apresenta-se o espectro de RMN referente à amostra de resina mantida 21 dias a uma temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$  e no escuro. No gráfico podemos observar que, nestas condições, os seus componentes não sofrem alterações significativas.



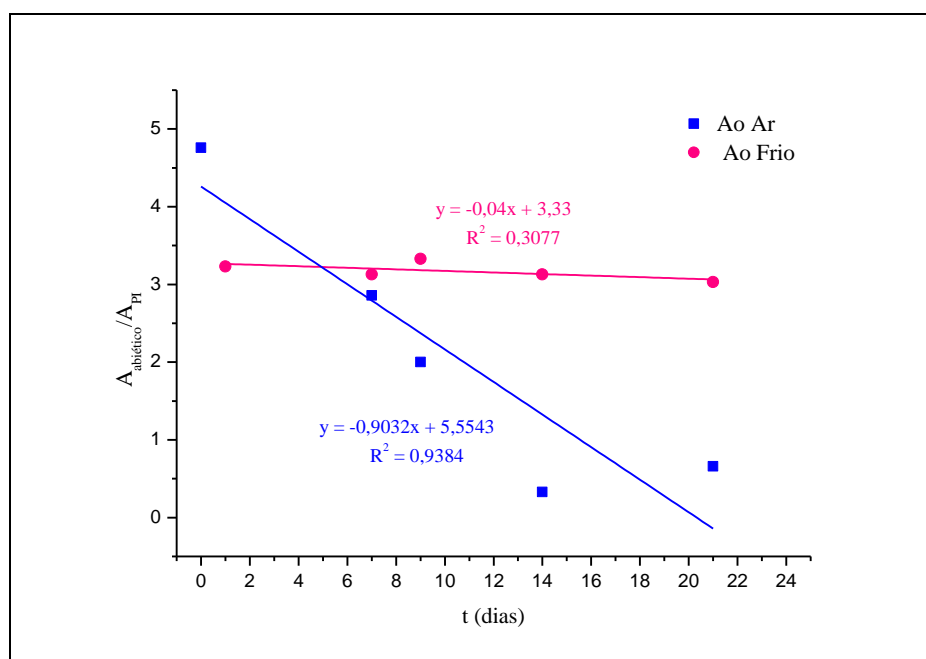
**Figura 3:** Espectro de RMN da resina à  $T=0^{\circ}\text{C}$  durante 21 dias

Na tabela 10 apresenta-se a relação entre a integração dos sinais de RMN-<sup>1</sup>H correspondentes ao ácido abiético e dehidroabiético.

**Tabela 10:** Relação de abiético/dehidroabiético da R2 ao frio e ao ar dado por RMN-<sup>1</sup>H

Resina 2	t <sub>inicial</sub>	1dia	7dias	9dias	14dias	21dias
$\frac{\text{Abiético}}{\text{Dehidroabiético}}$ ao ar	4,76	4,55	2,86	2	0,33	0,66
$\frac{\text{Abiético}}{\text{Dehidroabiético}}$ ao frio	4,55	3,23	3,13	3,33	3,13	3,03

Na figura 4 pode-se observar graficamente como varia a razão da área do abiético com a área do dehidroabiético em função do tempo exposta ao ar e à luz comparativamente com a amostra mantida no escuro a 0°C.



**Figura 4:** Variação da razão  $\frac{\text{Abiético}}{\text{Dehidroabiético}}$  em função do tempo de exposição à temperatura ambiente e a 0°C

A modificação do declive das rectas de  $\geq 0$  para 1 demonstra bem a influência da temperatura na estabilidade da composição da colofónia em solução. Pode-se verificar que mesmo à temperatura ambiente a modificação da composição da colofónia é significativa. Em 21 dias, a proporção de

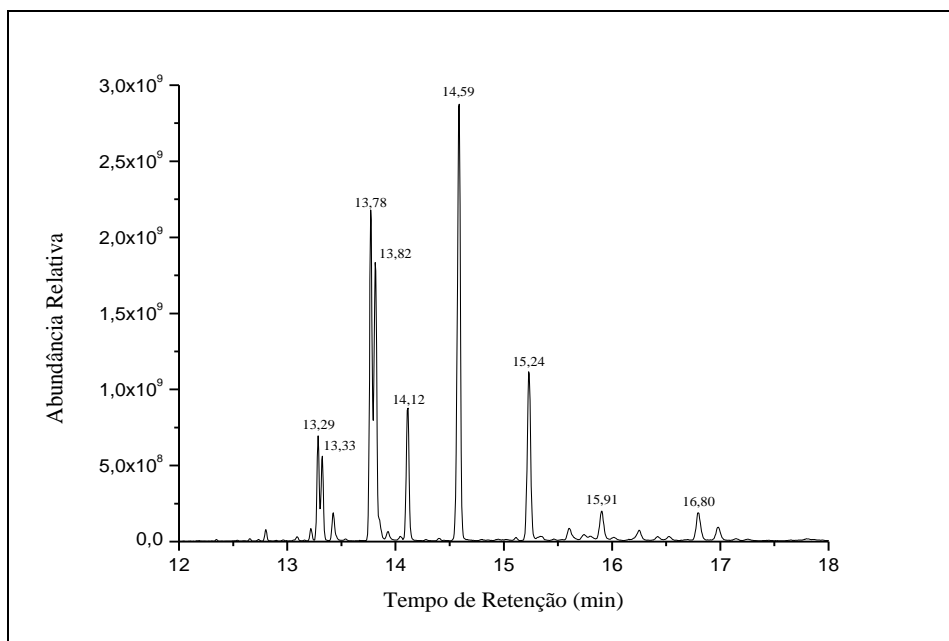
abiético/dehidroabiético inicial de 4,76 transforma-se em 0,66 o que corresponde a um aumento de aproximadamente 14% de ácido dehidroabiético.

### 2.1.2. GC-MS

A reduzida estabilidade da composição da colofónia com a temperatura, reduz as possibilidades de escolha de um método de derivatização eliminando qualquer uma das reacções que requeira elevados tempos de reacção ou elevadas temperaturas. A primeira escolha seria a derivatização com diazometano, pois a reacção desenvolve-se em condições neutras e na ausência de outros subprodutos de reacção além do azoto, além disso a reacção é muito rápida e imediata, prossegue a temperatura ambiente, é uma reacção completa e não necessita de purificação da mistura de reacção.

Ainda assim, devido ao facto de este procedimento ter de ser levado a cabo com elevadas medidas de segurança devido ao perigo associado à utilização deste reagente, pois o reagente precursor deste, o Diazald, é mutagénico e o próprio diazometano é carcinogénico e explosivo, sendo pouco recomendado para utilização industrial, decidiu-se explorar alguns métodos de derivatização alternativos.

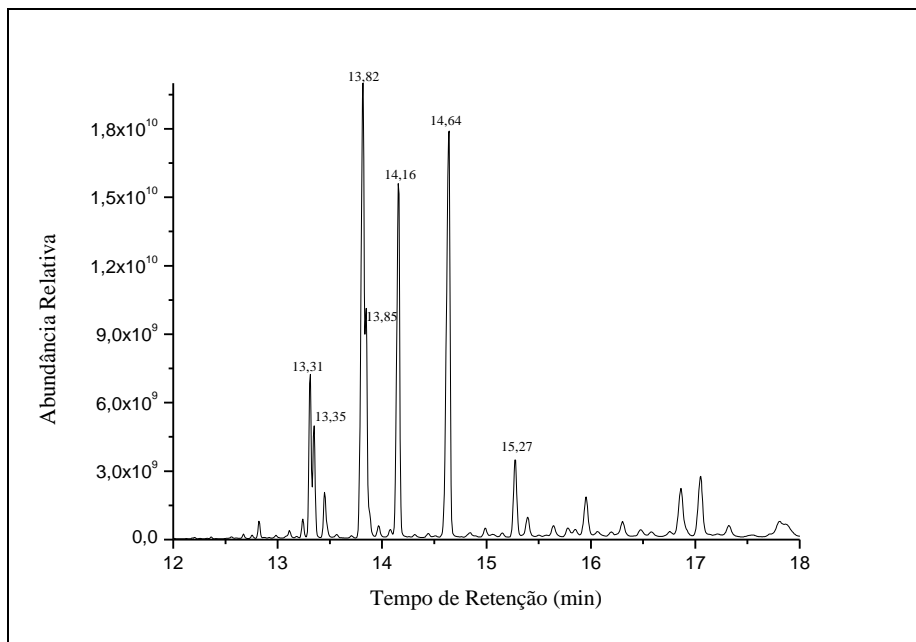
Numa primeira fase, tentámos derivatizar por métodos convencionais e por métodos de micro-ondas através da preparação de ésteres com haletos de alquilo na presença e ausência de base. Para facilitar a comparação, na figura 5 apresenta-se o cromatograma da amostra de resina R1 derivatizada com diazometano.



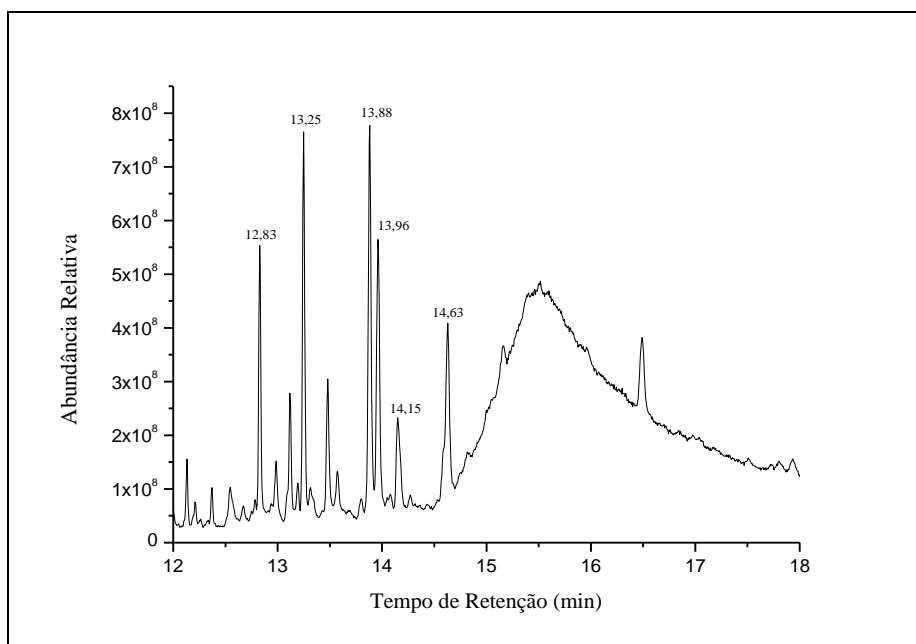
**Figura 5:** Cromatograma da amostra de resina R1

A colofónia, solubilizada em DMSO, foi esterificada com iodeto de metilo. Utilizando aquecimento convencional a 100°C durante duas horas na presença e ausência de base ( $K_2CO_3$ ). Foi possível observar por TLC a formação de esteres metílicos.

A análise do GC-MS das duas reacções, figuras 6 e 7, mostra que na presença de base a reacção é completa mas a relação entre os picos identificados como éster metílico do ácido abiético e dehidroabiético modifica-se substancialmente. No caso da reacção na ausência de base é evidente a degradação da amostra ao fim de 2 horas.

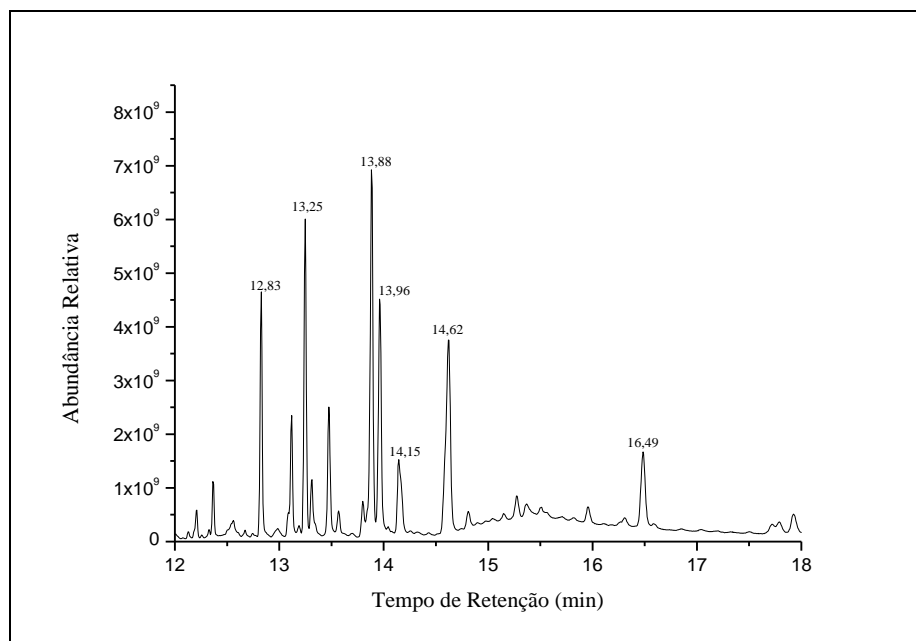


**Figura 6:** Cromatograma da amostra derivatizada com  $\text{CH}_3\text{I}$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$



**Figura 7:** Cromatograma da amostra derivatizada com  $\text{CH}_3\text{I}$

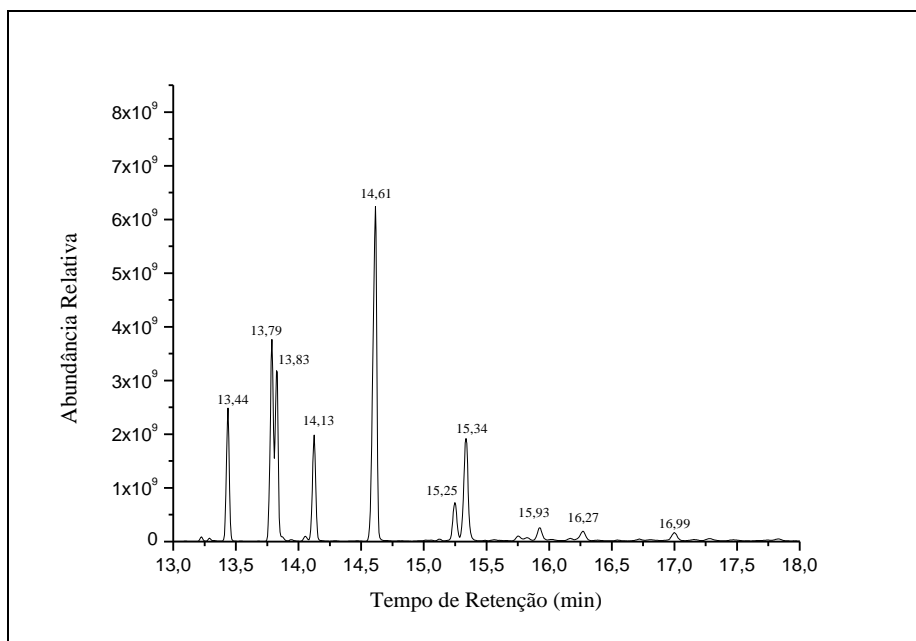
A derivatização assistida por micro-ondas com iodeto de metilo ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) e com carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) a  $100^\circ\text{C}$  durante 1 e 2 minutos dá lugar à formação de ésteres metílicos mas com uma produção drástica da percentagem de ácido abiético assim como o desaparecimento do componente com  $t_R = 15,24$  min.



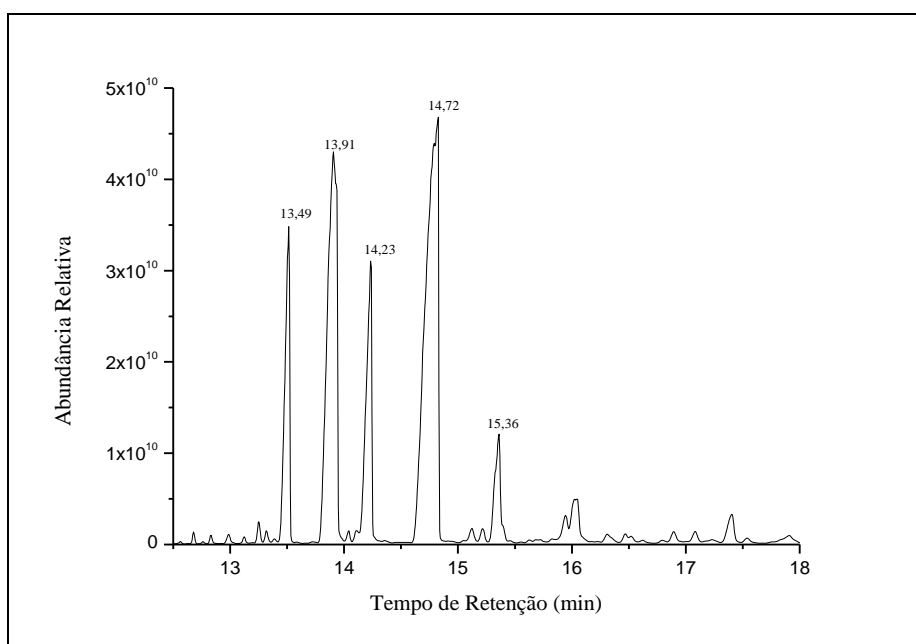
**Figura 8:** Cromatograma da amostra derivatizada sob irradiação de MW com  $\text{CH}_3\text{I}$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$

A esterificação com metanol catalisada por ácido utilizando aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas foi realizada utilizando diferentes condições de reacção e resina seca por destilação da mistura azeotrópica com tolueno. Nas reacções com aquecimento convencional o tempo de reacção foi variado entre 2 horas e 7 dias, à temperatura de refluxo do metanol. Nas reacções em ambiente de micro-ondas o tempo de reacção foi variado entre 2 e 20 minutos. Em ambos os casos, como catalisador ácido foi utilizado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ou TFA. Para remover a água formada durante a reacção foram utilizados peneiros moleculares ou sulfato de sódio anidro. A análise por TLC do produto da reacção demonstrou que em nenhuma das condições utilizadas se obteve conversão completa. Para ilustrar estes casos, mostra-se nas figuras 9 e 10 o cromatograma da resina 2 derivatizada com diazometano e a resina obtida após a reacção em micro-ondas.

Neste tipo de derivatização observa-se uma extensa modificação na composição da resina desaparecendo o ácido abiético e modificando também as percentagens de ácidos pimáricos.



**Figura 9:** Cromatograma da amostra de resina 2 derivatizada com diazometano



**Figura 10:** Cromatograma do produto da reacção com MeOH, catalisado com TFA durante 5 minutos a 100°C sob irradiação de micro-ondas

A derivatização dos ácidos resínicos na forma de anidridos foi realizada na presença de anidrido acético utilizando acetato de sódio ou trietilamina como



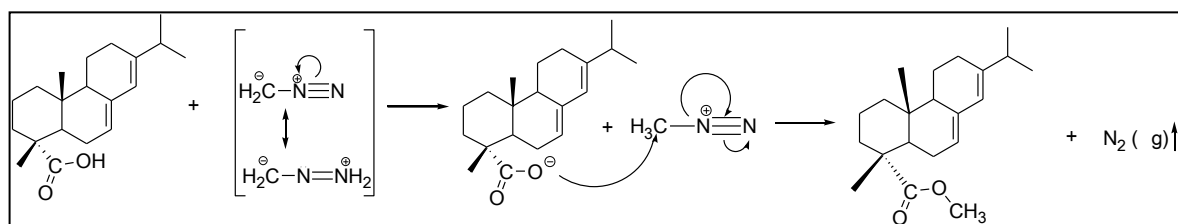
base. Foi possível observar a formação dos produtos por TLC após 15 minutos de reacção. A reacção da colofónia na presença de anidrido acético e acetato de sódio sob irradiação de micro-ondas a 100°C, durante 5 minutos. Após a reacção é retirado o excesso de anidrido com fluxo de azoto e por TLC foi observada a formação de produto. O aumento do tempo de reacção até 30 minutos não dá lugar a um aumento apreciável dos produtos de reacção.

Os métodos descritos mostraram-se pouco viáveis mesmo nos casos em que a análise por TLC permite a observação da formação dos ésteres. A conversão não era total, obtendo-se na maioria dos casos parte da amostra não derivatizada. Ainda, nos casos em que se obteve uma maior conversão, a análise por GC-MS dos ésteres obtidos mostra modificações drásticas da composição da resina.

### 2.1.3. Derivatização com Diazometano

A derivatização das amostras é feita com o objectivo de analisar os componentes da colofónia e quantificar o ácido abiético.

Optou-se por realizar uma derivatização com diazometano por ser um método mais rápido, eficaz, completo, sem formação de produtos secundários e não necessita de purificação da mistura de reacção para a quantificação do ácido abiético e qualificação/determinação dos componentes da colofónia.



**Figura 11:** Esquema do mecanismo de derivatização do diazometano

Foram pesadas 2 mg de todas as amostras de colofónia fornecidas por seis empresas e procedeu-se à diluição das mesmas em éter etílico e em seguida foi adicionado o diazometano às 12 amostras. Analisando o TLC observou-se a formação de produto. Procedeu-se à evaporação do éter e do diazometano com atmosfera de azoto. Todas as amostras foram mantidas em frasco fechado, em

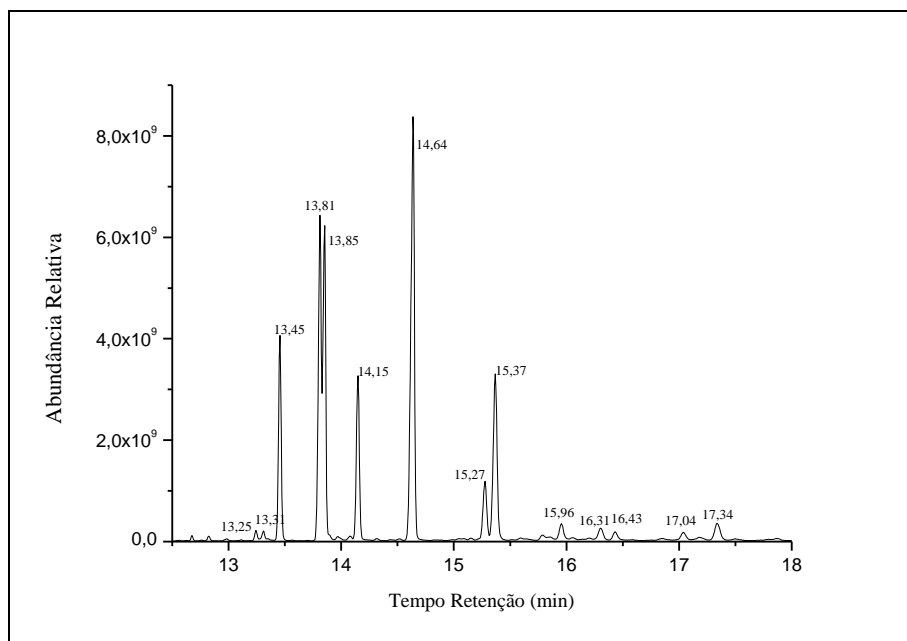
atmosfera de azoto, no escuro e a 0°C até a realização de análise por GC-MS, já que como se pode observar na tabela abaixo a modificação da composição da colofónia esterificada a temperatura ambiente e exposta ao ar é muito mais intensa que a modificação da colofónia constituída por ácidos resínicos, tabela 11.

A exposição ao ar durante 15 dias promove a modificação da relação ácido abiético/ácido dehidroabiético de forma drástica.

**Tabela 11:** Modificação da área relativa dos ésteres de ácido abiético e dehidroabiético pela exposição ao ar a temperatura ambiente

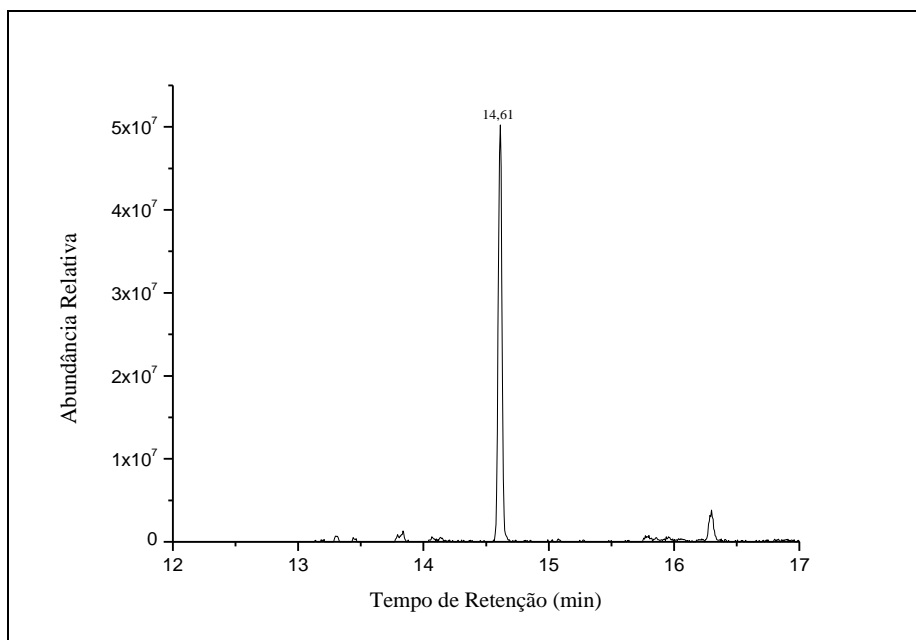
Resinas	Frescas		Relação ab/dehidro	Após 15 dias da preparação à temperatura ambiente		Relação ab/dehidro
	%Abiético	%Dehidro		%Abiético	%Dehidro	
	<b>R2</b>	32,89		8,62	<b>3,82</b>	
<b>R4</b>	23,91	12,61	<b>1,90</b>	13,67	20,85	<b>0,66</b>
<b>R7</b>	30,64	8,70	<b>3,52</b>	6,64	32,75	<b>0,20</b>
<b>R9</b>	21,80	9,26	<b>2,35</b>	4,87	25,63	<b>0,19</b>
<b>R12</b>	36,73	7,91	<b>4,64</b>	0,45	14,21	<b>0,03</b>
<b>R13</b>	31,67	9,95	<b>3,18</b>	0,18	12,61	<b>0,01</b>

Na figura 12 mostra-se o cromatograma total dos esteres da resina 10 com os respectivos tempos de retenção.



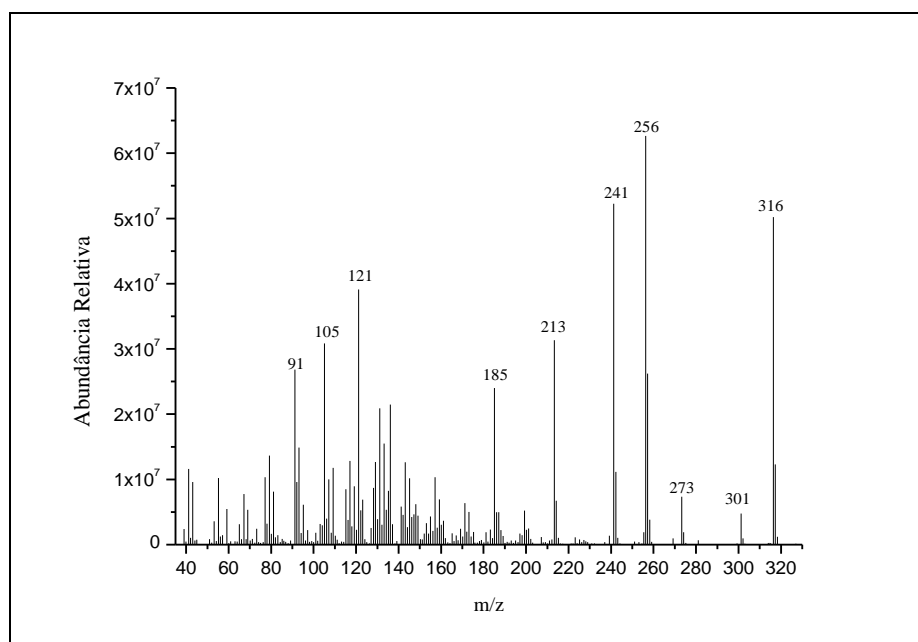
**Figura 12:** Cromatograma da resina R10 com todos os tempos de retenção

O pico cromatográfico de ácido abiético foi identificado usando o ácido abiético puro cujo cromatograma está representado na figura 13.



**Figura 13:** Cromatograma do ácido abiético padrão

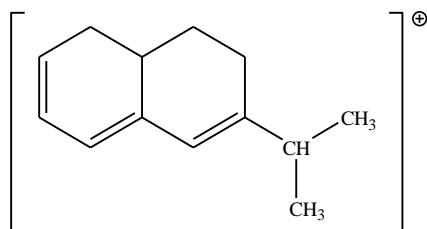
Nas figuras 14 e 19 mostram-se os espectros de massa dos picos dos componentes da colofónia que foi possível identificar.



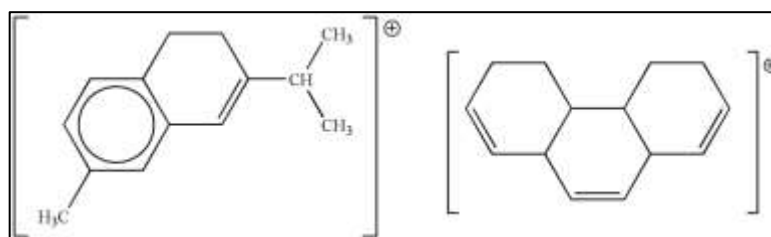
**Figura 14:** Espectro de massa do ácido abiético

Em todas as resinas derivatizadas aparecem fragmentos com  $m/z=173$ , 185, 241, e 257 numa mais intensos do que noutras, mas em geral aparecem em todas, em alguns  $t_R$  como  $t_R=14,16$ ;  $t_R=14,6$ ,  $t_R= 13,81$  ou  $t_R= 13, 85$  e ainda no  $t_R= 13,31$  ou  $t_R= 13,46$ . Nas figuras seguintes (15 a 18) apresentam-se as estruturas possíveis para estes fragmentos no caso do ácido abiético.

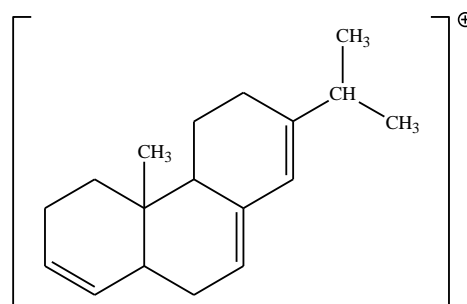
A fragmentação apresentada para o ácido abiético será a seguinte:



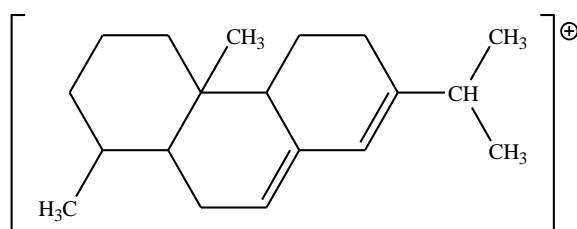
**Figura 15:** Fragmento possível para  $m/z= 173$



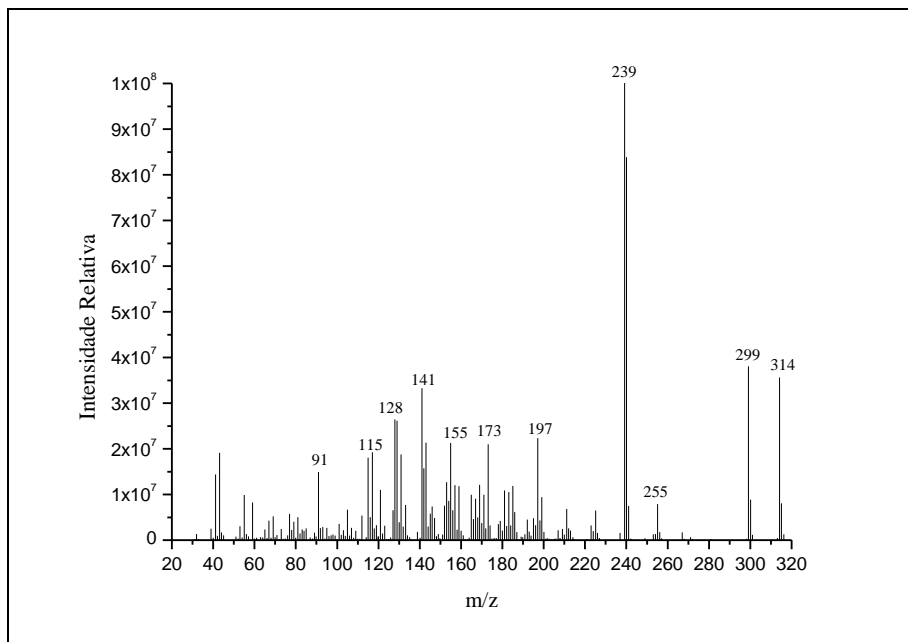
**Figura 16:** Fragmentos possíveis para  $m/z=185$



**Figura 17:** Fragmento possível para  $m/z=241$

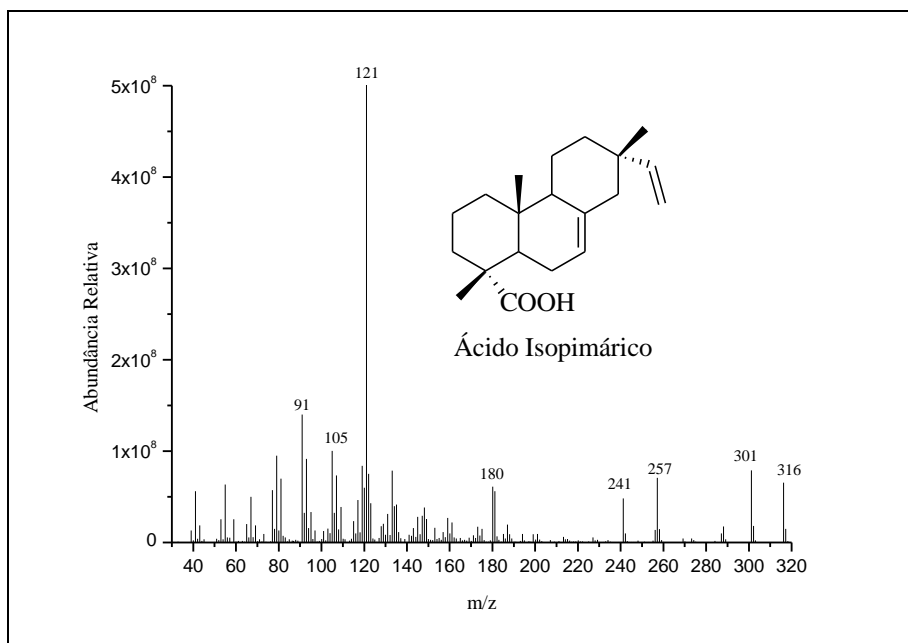


**Figura 18:** Fragmento possível para  $m/z=257$



**Figura 19:** Espectro de massa do ácido dehidroabético

Nas figuras 20, 21 e 22 apresenta-se o espectro de massa dos três picos cromatográficos atribuídos aos ácidos pimáricos e a respectiva atribuição.



**Figura 20:** Espectro de massa a  $t_R = 13,45$  min

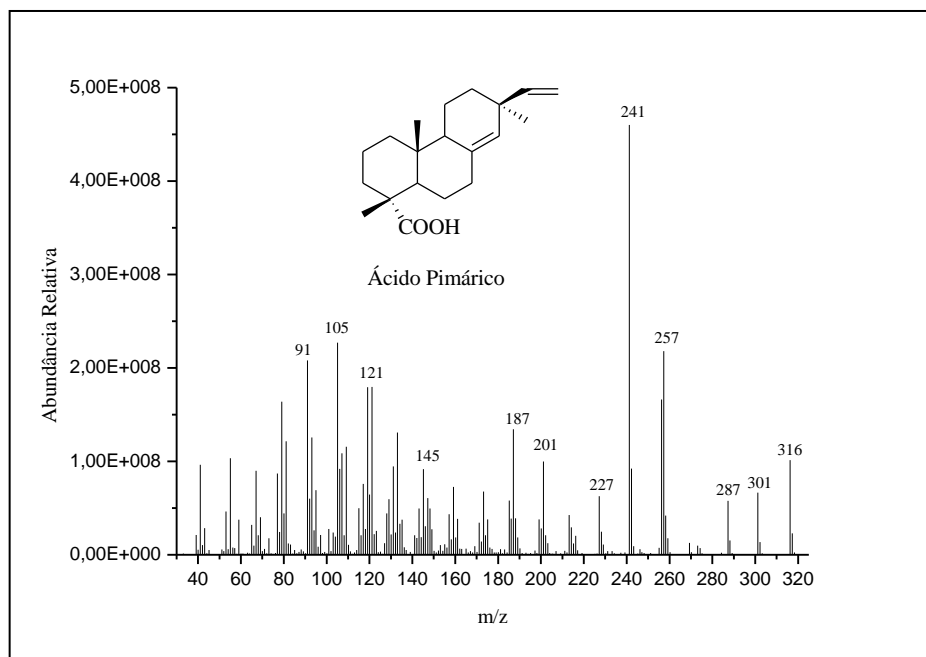


Figura 21: Espectros de massa a  $t_R = 13,81$  min

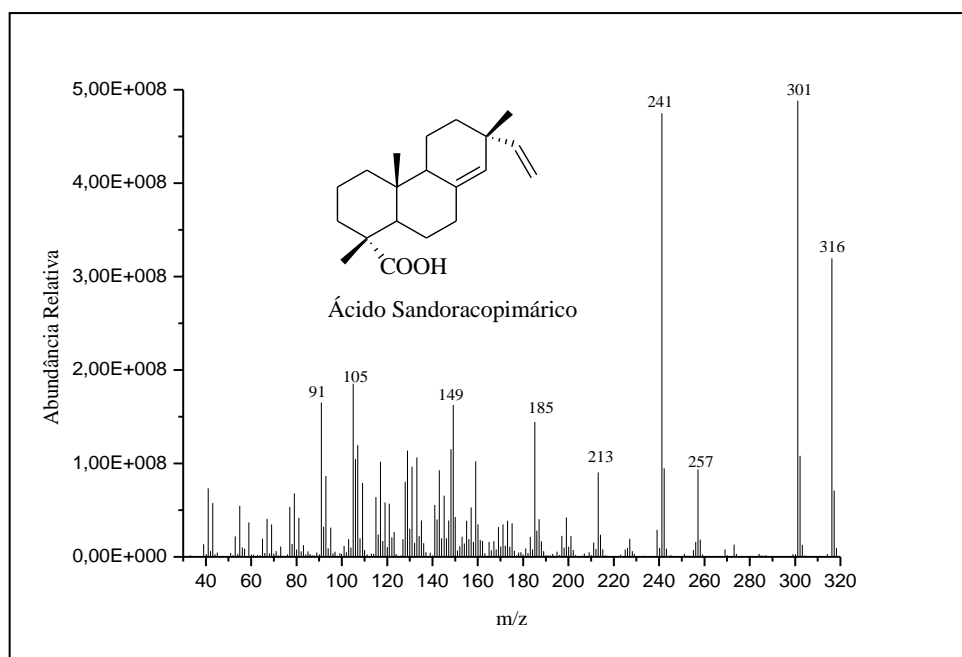


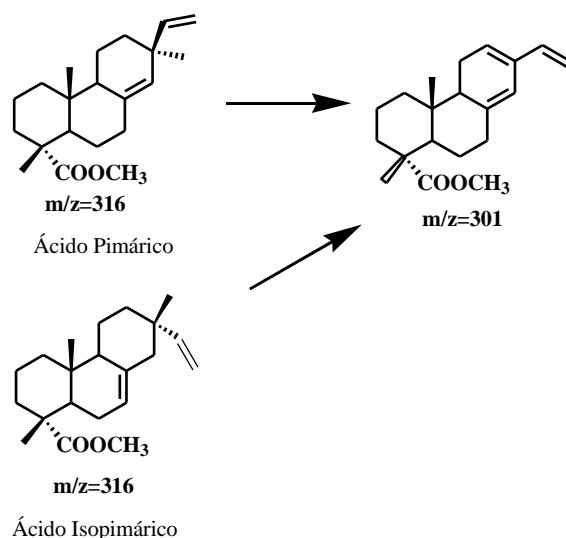
Figura 22: Espectros de massa a  $t_R = 13,85$  min

Ao longo do nosso estudo conseguimos identificar alguns componentes da colofónia. Alguns claramente, como o ácido abiético, através da sua massa e por comparação com o ácido abiético de compra da Aldrich, o ácido dehidroabiético, através da sua massa pois é o único ácido resínico com massa de 314. Os outros componentes, como o pimárico, o isopimárico e o

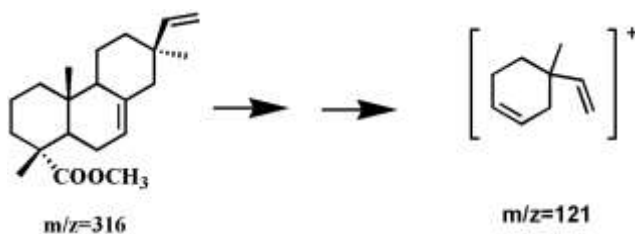
sandarocopimárico não foram tão fáceis de distinguir. Todos eles são isômeros de massa com  $m/z$  de 316. O ácido isopimárico apresenta o espectro de massa mais distinto dos três por possuir um pico muito intenso a  $m/z=121$ . Já os outros são diastereoisômeros e portanto é espectável que apresentem espectros de massa muito semelhantes.

A atribuição realizada é confirmada pela realizada por Smith e seus colaboradores [18], os autores do estudo conseguiram distinguir mais componentes por GC-MS que atribuem aos ésteres metílicos de ácidos de resina com um único átomo de oxigênio adicional.

O ácido isopimárico diferencia-se dos outros isômeros pela presença de um pico de fragmentação a 121 u.m.a cuja possível fragmentação pode ser observada nos esquemas seguintes.



**Esquema 1:** Fragmentação dos ácidos pimáricos



**Esquema 2:** Possível fragmentação do ácido isopimárico



Nas tabelas seguintes (12 a 23) apresentam-se as amostras de resina com os tempos de retenção dos “componentes conhecidos” de cada amostra e respectiva massa e % relativa.

**Tabela 12:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R1

	$t_R$ (min)	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R1 (Indonésia)</b>	13,45	Isopimárico	316	1,16
	13,81	Pimárico e	316	11,89
	13,85	Sandarocopimárico	316	0,56
	14,15	Dehidroabiético	314	5,65
	14,64	Abiético	316	20,24

**Tabela 13:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R2

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R2 (Indonésia)</b>	13,45	Isopimárico	316	7,25
	13,81	Pimárico e	316	12,12
	13,85	Sandarocopimárico	316	0,30
	14,15	Dehidroabiético	314	4,72
	14,64	Abiético	316	26,37

**Tabela 14:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R3

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R3 (Portugal)</b>	13,45	Isopimárico	316	7,41
	13,81	Pimárico e	316	11,80
	13,85	Sandarocopimárico	316	0,20
	14,15	Dehidroabiético	314	4,72
	14,64	Abiético	316	25,95

**Tabela 15:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R4

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R4</b> <b>(EuroChemicals)</b>	13,45	Isopimárico	316	1,54
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	6,77
	13,85		316	0,40
	14,15	Dehidroabiético	314	10,51
	14,64	Abiético	316	13,85

**Tabela 16:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R5

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R5</b> <b>(China)</b>	13,45	Isopimárico	316	1,58
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	10,91
	13,85		316	0,30
	14,15	Dehidroabiético	314	8,15
	14,64	Abiético	316	30,91

**Tabela 17:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R6

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R6</b> <b>(Indonésia)</b>	13,45	Isopimárico	316	7,33
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	16,90
	13,85		316	0,61
	14,15	Dehidroabiético	314	4,88
	14,64	Abiético	316	15,53

**Tabela 18:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R7

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R7</b> <b>(Portugal)</b>	13,45	Isopimárico	316	1,34
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	15,60
	13,85		316	1,30
	14,15	Dehidroabiético	314	9,90
	14,64	Abiético	316	19,91

**Tabela 19:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R8

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R8 (China)</b>	13,45	Isopimárico	316	1,60
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	15,83
	13,85		316	0,44
	14,15	Dehidroabiético	314	5,12
	14,64	Abiético	316	33,61

**Tabela 20:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R9

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R9 (Brasil)</b>	13,45	Isopimárico	316	0,97
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	8,40
	13,85		316	0,66
	14,15	Dehidroabiético	314	6,43
	14,64	Abiético	316	10,10

**Tabela 21:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R10

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R10 (Indonésia)</b>	13,45	Isopimárico	316	6,51
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	12,61
	13,85		316	0,22
	14,15	Dehidroabiético	314	6,20
	14,64	Abiético	316	15,93

**Tabela 22:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R12

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R12 (Portugal)</b>	13,45	Isopimárico	316	1,03
	13,81	Pimárico e Sandarocopimárico	316	8,32
	13,85		316	0,31
	14,15	Dehidroabiético	314	7,01
	14,64	Abiético	316	17,91

**Tabela 23:** Tempo de retenção,  $M^+$  e % relativa da Amostra R13

	$t_R$	Componente	$M^+$	% Relativa
<b>Amostra R13 (Portugal)</b>	13,45	Isopimárico	316	0,96
	13,81	Pimárico e	316	10,01
	13,85	Sandarocopimárico	316	0,42
	14,15	Dehidroabiético	314	8,45
	14,64	Abiético	316	14,92

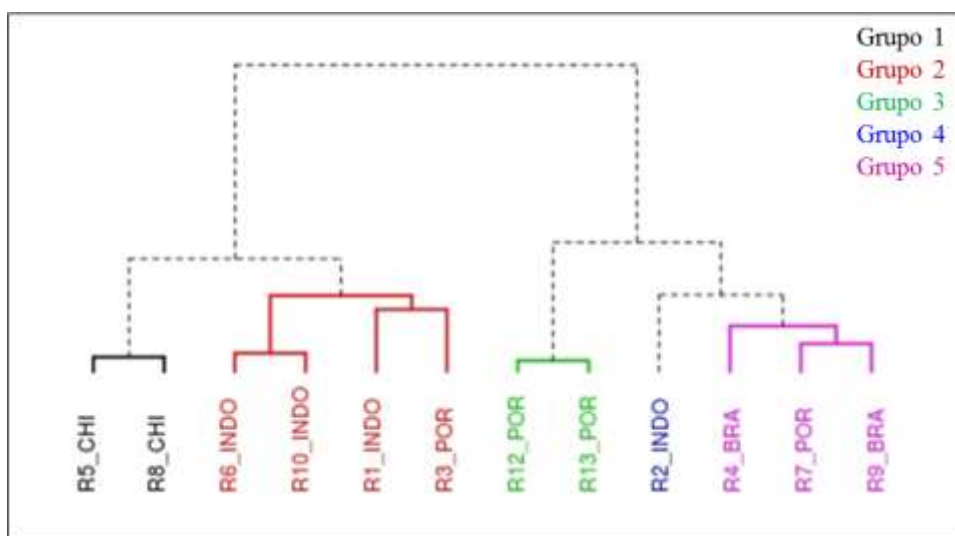
Esta análise foi necessária pois verificou-se uma alteração na percentagem dos componentes principais da resina (ácido abiético e dehidroabiético), como visto na tabela acima.

## 2.1.4. Análise Quimiométrica

### 2.1.4.1. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise hierárquica de agrupamentos interliga os objectos utilizando o critério de semelhança/diferença definido, produzindo como resultado uma estrutura hierárquica, o dendrograma, onde os objectos semelhantes estão agrupados entre si (quanto menor a distância entre os objectos, maior a semelhança entre eles) [45].

Neste trabalho, foram analisadas 12 resinas provenientes de 4 países diferentes tendo em conta os valores das áreas relativas correspondentes a 14 picos cromatográficos, excluindo os que apresentavam integrações inferiores a 0,1%.



**Figura 23:** Dendrograma correspondente ao agrupamento das 12 resinas analisadas com diferentes origens

Através do dendrograma da figura 23 podemos observar que numa primeira análise conseguimos separar em grupos, tendo em conta o perfil geográfico em termos de origem, as 12 resinas analisadas.

Podemos ver que num primeiro grupo temos as duas resinas da China, no segundo grupo encontram-se três resinas da Indonésia e ainda uma resina de

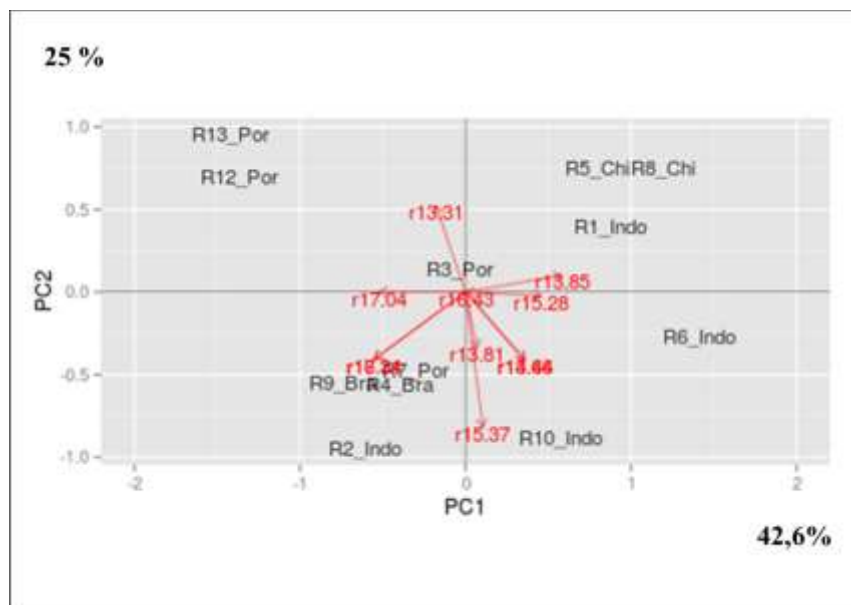
Portugal, ou seja, provavelmente a resina R3 tem características comuns às resinas R6, R10 e R1.

No terceiro grupo temos duas resinas de Portugal e no quinto grupo duas resinas do Brasil seguidas de uma resina portuguesa. O grupo 4, possui apenas uma resina proveniente da Indonésia, que provavelmente terá características semelhantes às resinas de Portugal e do Brasil.

Numa primeira abordagem é isto que podemos dizer, mas provavelmente num segundo olhar sobre o dendograma e analisando o facto da resina de Portugal ser “parecida” com as da China e da Indonésia tal indicará que supostamente a resina portuguesa não está bem catalogada. O mesmo se aplica à resina da indonésia que aparece perto das brasileiras e das portuguesas. Mas só se poderia confirmar através de repetição do estudo com um maior número de amostras.

Após a definição do número de grupos por HCA, passamos à análise do PCA de modo a determinar as áreas relativas características das resinas de diferentes origens associadas a tempos de retenção específicos.

A análise de componentes principais (PCA) é um método quimiométrico que permite a reorganização da informação num conjunto de amostras de dados. Este método pode ser utilizado quando o conjunto contém informações apenas em algumas variáveis, mas torna-se mais útil quando há um grande número de variáveis, como em dados espectroscópicos [39].



**Figura 24:** Posição relativa das resinas provenientes de 4 países diferentes sob o plano PC1 vs PC2, (co-variância), considerando a **percentagem relativa** sob a forma de vectores com recuperação de total informação de cerca de 67,6%

Através do gráfico da figura 24 podemos confirmar aquilo que o HCA nos diz. Isto é, ao analisar o gráfico podemos reparar que as resinas de Portugal continuam agrupadas da mesma forma, tal como as da China, do Brasil e da Indonésia.

A análise é baseada na informação contida nas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2). A componente PC1 retém informação correspondente a tempos de retenção de 13,85 min, 17,34 min, 16,31 min, 17,04 min, 15,28 min. Através do PC1 pode-se dizer que as resinas de Portugal (R12 e R13) apresentam picos com  $t_R = 17,04$  min. No extremo oposto encontram-se as amostras da China (R5 e R8) e da Indonésia (R1) onde podemos afirmar a presença de picos com  $t_R=13,85$  e a ausência de picos com  $t_R=17,04$  diferenciando-se deste modo das resinas de Portugal. Através do PC2 observa-se que as resinas do Brasil (R4 e R9) têm picos característicos a  $t_R=16,31$  min e a  $t_R=15,37$  min. No extremo, as resinas provenientes da Indonésia (R2 e R10) possuem picos característicos de a  $t_R=15,37$ , diferenciando-se totalmente, por exemplo, da resina de Portugal (R12).

## 2.2. Determinação da Concentração do Ácido Abiético em Colofónia

A análise quantitativa foi efectuada através de uma curva de calibração. A calibração é um processo pelo qual a intensidade do pico cromatográfico (área) é relacionada com uma concentração conhecida [26].

A fiabilidade de um método analítico de quantificação de uma substância implica a determinação dos seguintes parâmetros essenciais: a selectividade e especificidade, a linearidade, sensibilidade, os limiares analíticos (LD e LQ e a precisão e a exactidão.

Estes parâmetros foram avaliados num aparelho de cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massa (GC-MS) com auxílio de uma coluna cromatográfica utilizada é uma HP-5ms, 30\*0,25\*DF 0,25 e com recurso a padrões de calibração.

Durante a validação do método, todas as operações matemáticas e estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Excel 2010.

### 2.2.1. **Selectividade e Especificidade**

Para analisar a selectividade e especificidade do método utilizado ao longo da validação foi feita a derivatização com diazometano das amostras de resina e do padrão de abiético. Assim, foi realizada a análise de uma amostra e do padrão de ácido abiético e foi feita a comparação das duas amostras para confirmação do tempo de retenção e identificação do pico cromatográfico do analito.

Verifica-se que o pico correspondente ao ácido abiético se apresenta bem resolvido e inequívoco relativamente aos restantes compostos presentes na amostra.



2.2.2. Linearidade

i. Teste Visual

A linearidade pode ser demonstrada pelo método visual que relaciona os sinais obtidos na análise com a concentração do analito. Para tal utilizou-se o colesterol como padrão interno (PI), sendo derivatizado com diazometano e com tempo de retenção de 28,15 min.

Através deste teste estabeleceu-se que no estudo em causa o coeficiente de correlação deve ser  $\geq$  a 0,95.

O sinal obtido para cada padrão de concentração apresenta-se na tabela 24.

**Tabela 24:** Sinal obtido para cada padrão de concentração

[Padrão] (mg/mL)	$\frac{A_{abiético} 1}{A_{PI}}$	$\frac{A_{abiético} 2}{A_{PI}}$	$\frac{A_{abiético} 3}{A_{PI}}$	$\frac{A_{abiético} 4}{A_{PI}}$	$\frac{A_{abiético} 5}{A_{PI}}$	$\frac{A_{abiético} 6}{A_{PI}}$
0,2	0,1739081	0,1890222	0,1964789	0,2041093	0,1865066	0,2391678
0,7	0,6442254	0,6951898	0,7854386	0,7361413	0,6992799	0,7547465
1,2	1,4737899	1,6644136	1,5814027	1,1607077	1,4953622	1,5210217
1,7	2,1849694	2,1358493	1,9201193	2,0553056	1,9629549	1,9872128
2,2	2,1711675	2,4167014	2,5119835	2,2956813	2,1516342	2,5136751
2,7	3,5189221	3,895733	3,7724731	3,2963253	3,3420915	3,781835

Estes valores permitem desenhar as seguintes curvas de calibração segundo o método dos mínimos quadrados (Figuras 25 a 30).

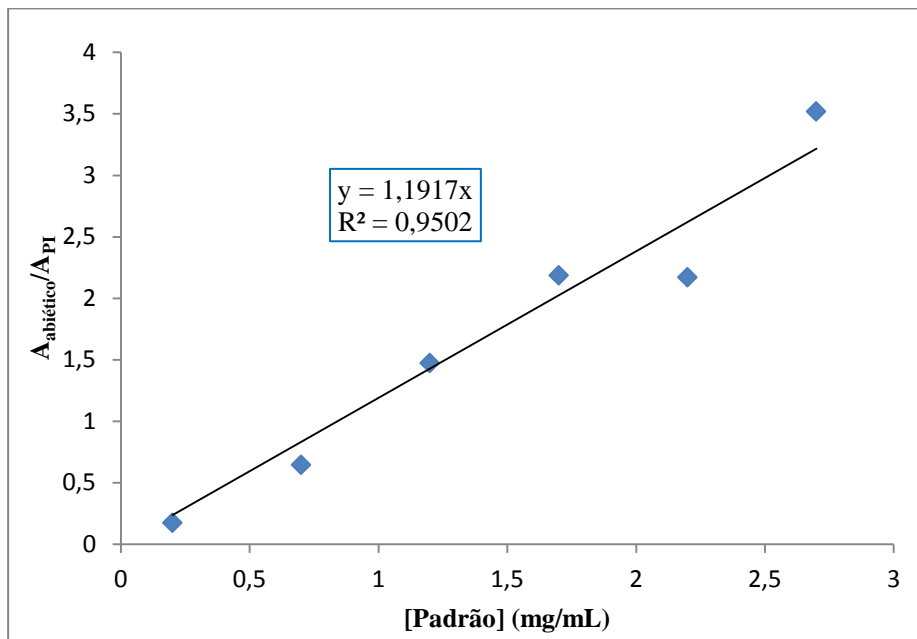


Figura 25: Réplica 1

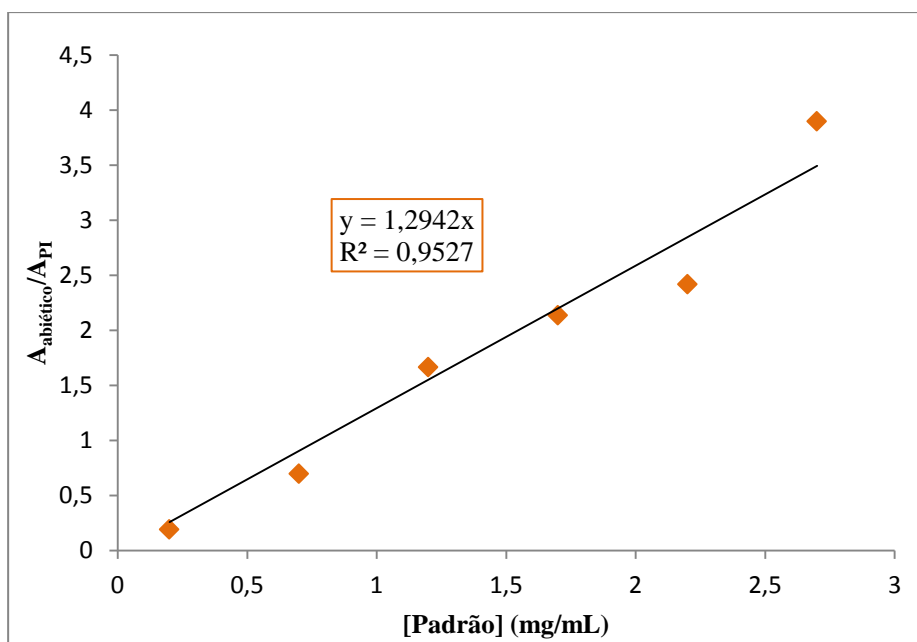


Figura 26: Réplica 2

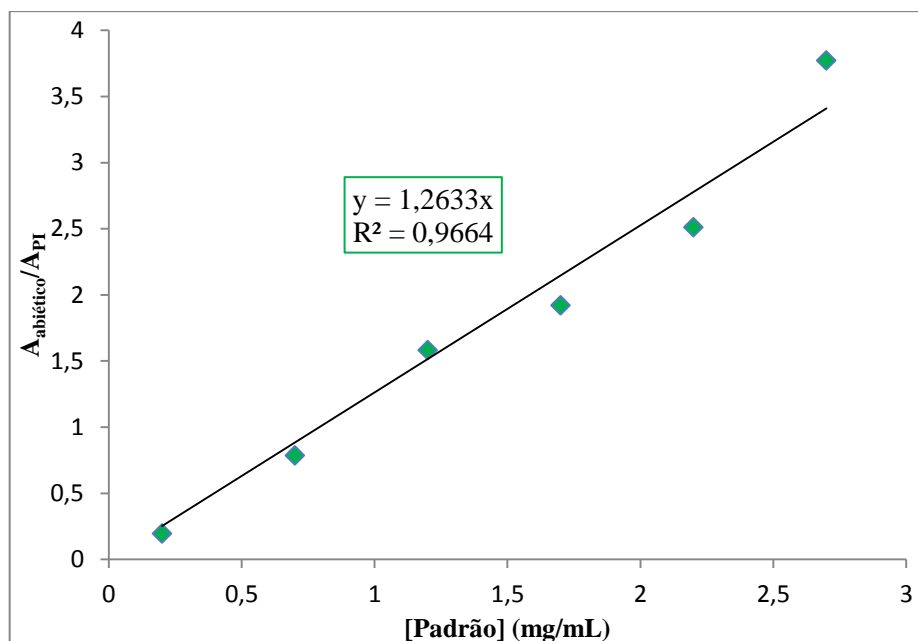


Figura 27: Réplica 3

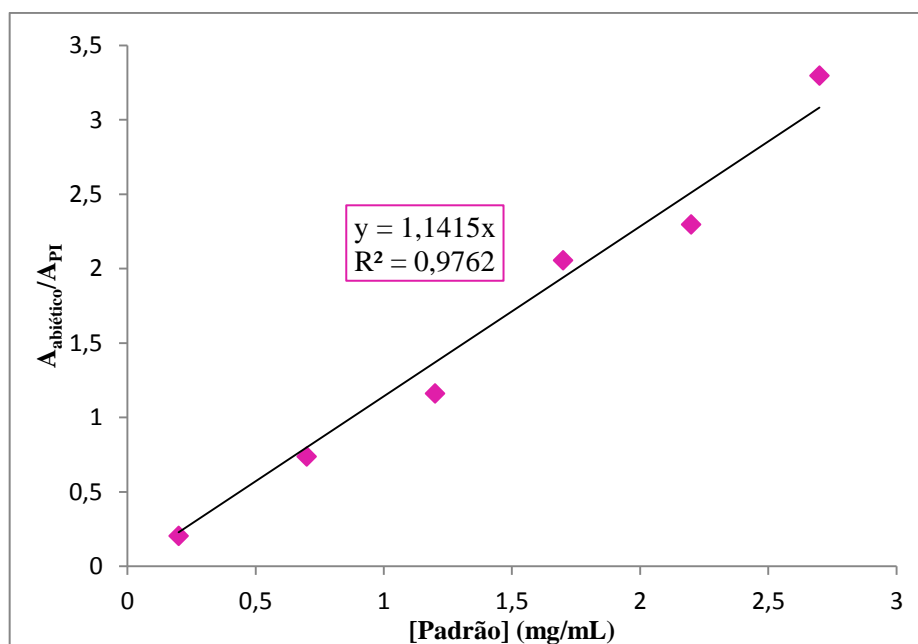


Figura 28: Réplica 4

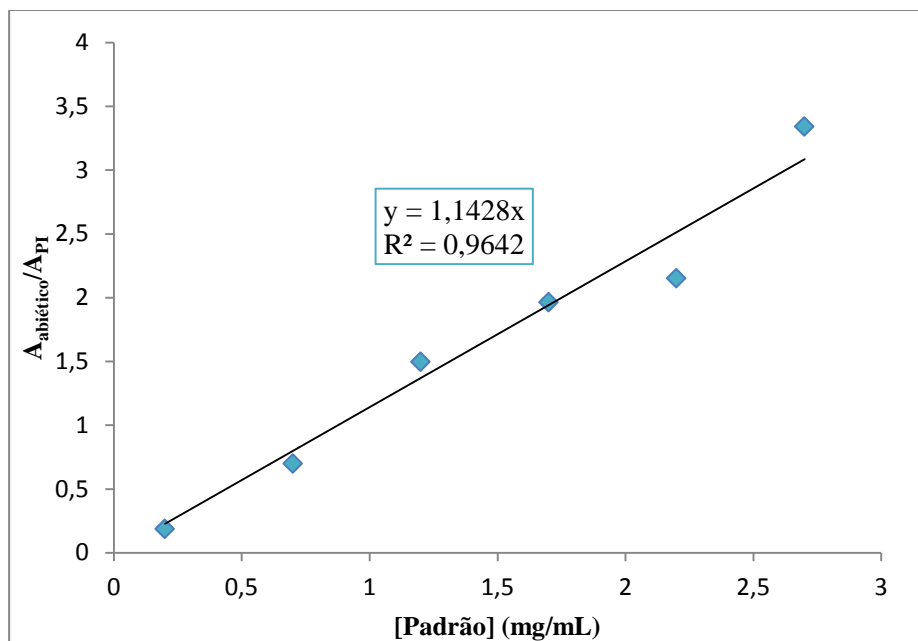


Figura 29: Réplica 5

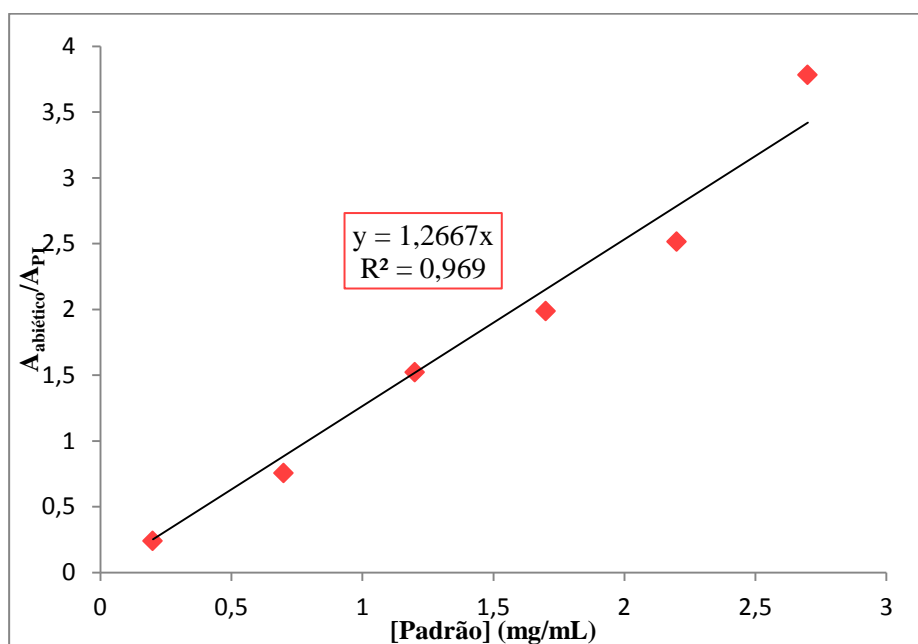


Figura 30: Réplica 6

Como o valor do coeficiente de correlação é superior a 0,95 (critério inicial estipulado para este método), considera-se que há linearidade e a recta de calibração é uma boa representação do sinal em função da concentração.

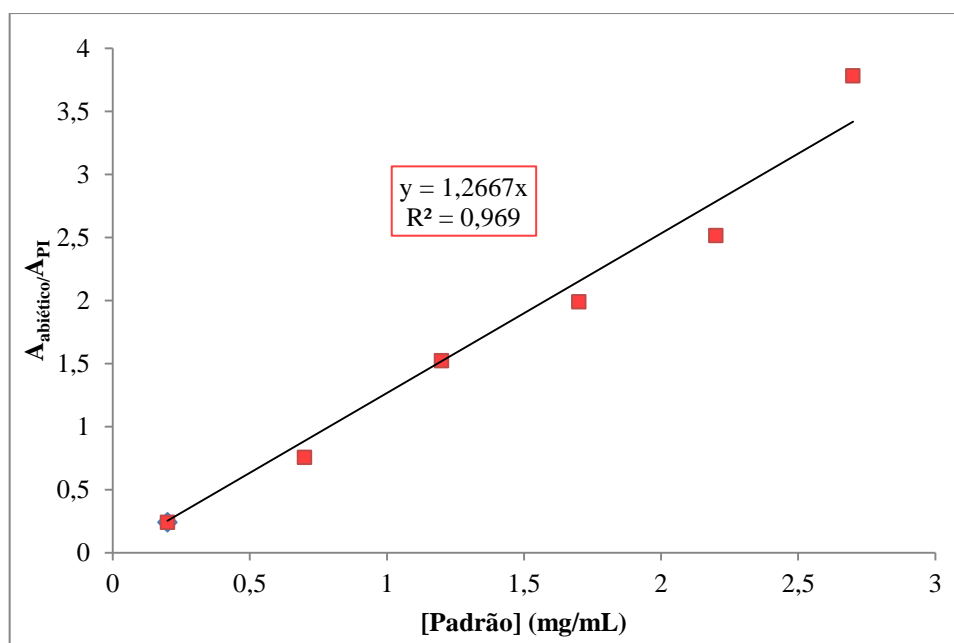
**ii. Teste de Mandel**

Para comprovar a linearidade do método de validação recorre-se a um estudo estatístico dos parâmetros da recta de calibração através do teste de Mandel. Verifica-se a linearidade através da função de calibração de primeiro grau  $y = ax + b$  onde  $a$  é o declive,  $b$  a ordenada na origem,  $x$  é a concentração e  $y$  é o quociente entre a área do abiético e a área do padrão interno.

Foram preparados seis padrões de calibração com diferentes concentrações, 0,2; 0,7; 1,2; 1,7; 2,2; 2,7 mg/mL. Para todos eles foram realizadas 6 análises de cada concentração para posteriormente comparar o valor da área do abiético com o valor da área do padrão interno.

Dessas 6 réplicas escolheu-se uma para realizar o teste de Mandel, sendo aquela com coeficiente de correlação intermédio ( $R = 0,969$ ), apresentado na figura 40.

No teste de Mandel foi realizado o estudo da função quadrática,  $y = 0,1472x^2 + 0,9432x$  com um  $R = 0,9831$ . Comparando os desvios padrão residuais,  $s_{y_1} = 0,2239$  e  $s_{y_2} = 0,1850$  o valor de  $DS^2 = 0,1138$  e o valor de  $TV = 3,3244$ , com um  $F_{tab}$  (99% confiança),  $g_1=1$ ,  $g_2=4$  de 21,20. Deste modo pode-se concluir que  $F > TV$ , logo não há melhoria com a introdução da equação quadrática  $y = ax^2 + bx + c$ , sendo válida a equação linear  $y = ax + b$ .



**Figura 31:** Curva de Calibração

De seguida fez-se a análise dos residuais para testar se a aproximação funcional escolhida descreve adequadamente os resultados obtidos.

Para o cálculo dos residuais é necessário calcular o valor de  $d_i$  dado por

$$d_i = y_i - \hat{y}_i, \text{ para } i = 1, \dots, n \text{ (Equação 12)}$$

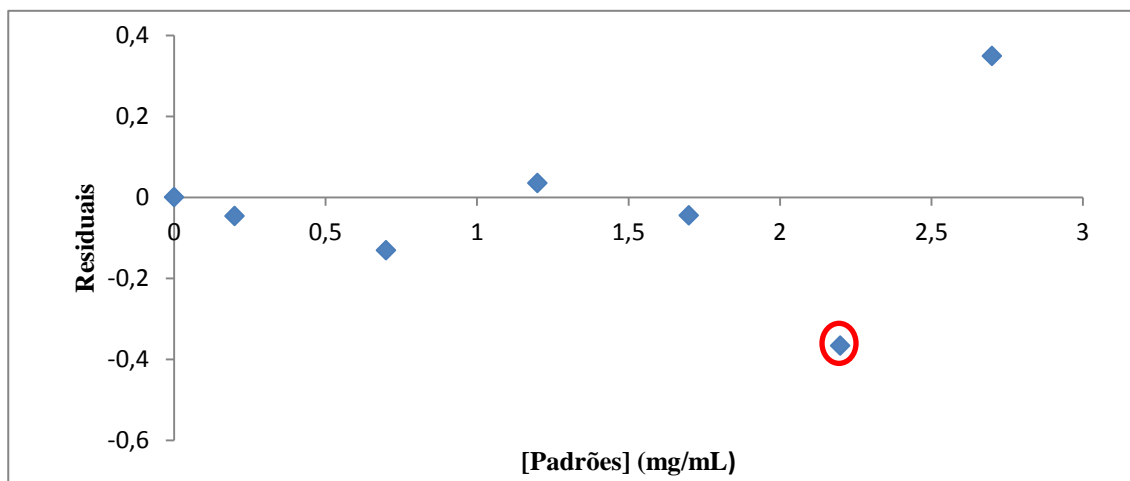


Figura 32: Análise de Residuais

O par de valores assinalado (2,2;2,36) é constituído um possível *outlier*. Deste modo, é retirado da primeira curva (figura 30) e é de novo calculado o declive, o coeficiente de correlação, os desvios padrão residuais associados, o parâmetro  $DS^2$ , o valor de TV e comparado com o valor de F tabelado.

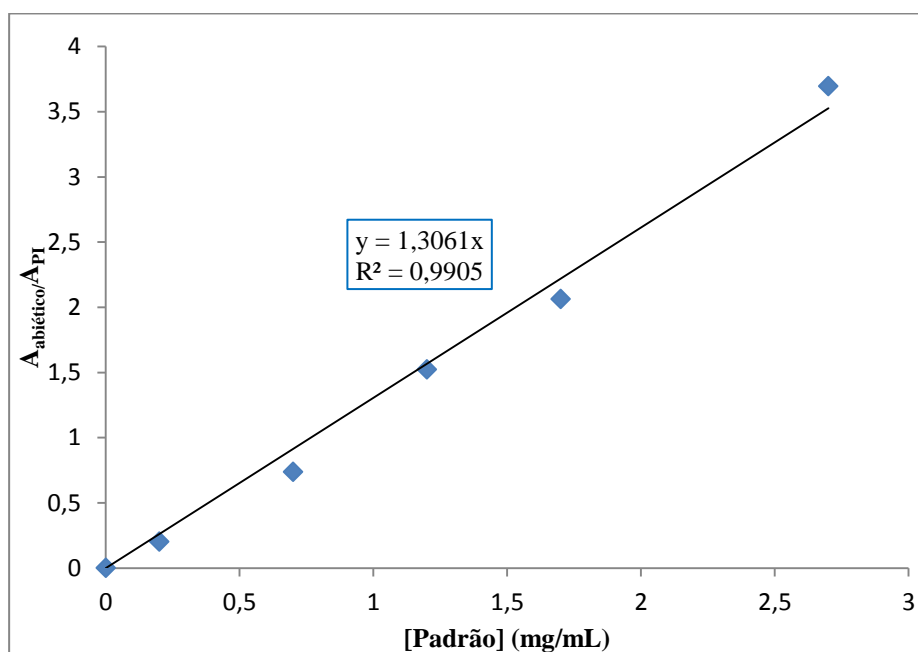


Figura 33: Recta de Calibração sem *outlier*

A curva de calibração obtida apresentou linearidade no intervalo de 0,2 a 2,7 mg/mL.

A equação da recta é dada por:

$$y = 1,3061x \text{ (Equação 13)}$$

onde  $y$  é o quociente do pico da  $A_{\text{abiético}}$  e do pico da  $A_{\text{PI}}$  e  $x$  a concentração do ácido abiético.

O coeficiente de correlação ( $R$ ) obtido foi de 0,9905, sendo um óptimo valor de  $R$  pois é superior ao estipulado.

Comparando os desvios padrão residuais,  $s_{y_1} = 0,2239$  e  $s_{y_2} = 0,1506$ , o valor de  $TV = 22,806$ , com um  $F_{\text{tab}}$  (95% confiança),  $g_1=1$ ,  $g_2=4$  de 7,71.

Como o  $TV > F$ , o ponto (2,2;2,36) é um *outlier*. Deste modo podemos corrigir o gráfico da análise dos resíduos, ilustrado na figura 34.

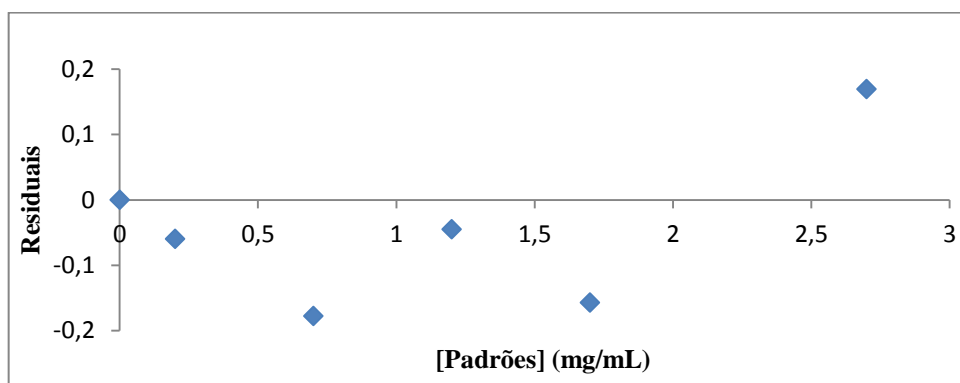


Figura 34: Análise de residuais na ausência de *outlier*

### 2.2.3. Aceitação de Declives

O estabelecimento do intervalo de confiança para a aceitação do declive da recta foi obtido a partir do cálculo da média dos declives das réplicas de calibração realizadas e calculado o limite inferior e superior. Como tal, procedeu-se à realização de seis curvas de calibração.

A tabela seguinte mostra os seis declives relativos às seis réplicas.

**Tabela 25:** Declives das rectas

Réplica	declive
1	1,3295
2	1,2942
3	1,2633
4	1,1415
5	1,1428
6	1,2667

Através destes valores é calculada a média sendo de 1,2397 e o desvio padrão de 0,0792 dos declives da recta. Para o cálculo da aceitação dos declives utiliza-se a média e o desvio padrão para determinar os limites superior e inferior associados, do modo seguinte:

$$\text{LimiteSuperior} = \bar{x} + (3 * s_x) = 1,4772 \quad \text{(Equação 14)}$$

$$\text{LimiteInferior} = \bar{x} - (3 * s_x) = 1,0021 \quad \text{(Equação 15)}$$

A partir destes valores é possível dizer que o declive da recta tem de obedecer ao intervalo [1,0021; 1,4772].

#### 2.2.4. Limiares Analíticos

##### i. Limite de Detecção

O limite de detecção é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar do sinal do ruído.

Uma vez que, não é possível obter um branco da amostra, a estimativa do LD através do sinal do branco também não é possível. E ainda, pela mesma razão a estimativa do LD pelo método da curva analítica (uma vez que este entra com a ordenada na origem no seu cálculo) também não é adequado.

Desta forma estimou-se o limite de detecção a partir do teste visual, recorrendo à análise de soluções obtidas a partir de diluições sucessivas da solução padrão de menor concentração da curva de calibração, 0,2 mg/mL.



**Tabela 26:** Leituras obtidas por diluições sucessivas da solução de 0,2 mg/mL

Nº de diluições	[padrão] (mg/mL)	$\frac{A_{abiético}}{A_{PI}}$
1 <sup>a</sup>	0,004	0,0135
2 <sup>a</sup>	0,008	0,0043
3 <sup>a</sup>	0,0016	0,0004
4 <sup>a</sup>	0,00032	0

Pela observação da tabela, verifica-se que uma estimativa razoável para um valor de LD majorado seria o de uma concentração de 0,004 mg/mL. Contudo, para garantir uma maior confiança nos resultados analíticos optou-se pelo uso do limite de quantificação como limiar analítico de detecção.

**ii. Limite de Quantificação**

O limite de quantificação é calculado através da análise de pelo menos 10 medições do padrão mais baixo da curva, neste caso, 0,2 mg/mL. Este limite depende da média e do desvio padrão do valor experimental ( $x_i$ ) calculado através da equação da recta  $y = ax + b$ , sendo  $b = 0$  neste caso. A estes valores estão associados um erro relativo. O critério estabelecido para a aceitação do limite de quantificação foi o de o erro relativo ser inferior a 10%.

Neste caso de estudo preliminar foram realizadas 10 medições relativamente a uma recta de calibração com declive de 1,3061. A média,  $\bar{x} = 0,2188$  e o desvio padrão  $s_{x1} = 0,0832$  são relacionados com a concentração do padrão mais baixo (0,2 mg/mL).

O limite de quantificação calculado está associado ao erro relativo e consoante os valores acima ilustrados o erro relativo é de 9,0432 %, ou seja, é menor do que 10% e portanto o LQ foi aceite como o padrão mais baixo da curva, 0,2 mg/mL.

**Tabela 27:** Leituras obtidas experimentalmente em dias diferentes para a solução padrão de 0,2 mg/mL

nº ensaio - data	valor experimental (xi)	y (Aab/API)
1 (03-06-14)	0,149159379	0,19481706
2 (03-06-14)	0,144722596	0,18902218
3 (04-06-14)	0,150431787	0,19647896
4 (05-06-14)	0,156273874	0,20410931
5 (06-06-14)	0,142796608	0,18650665
6 (11-06-14)	0,183116007	0,23916782
7 (25-07-14)	0,320486825	0,41858784
8 (25-07-14)	0,324551087	0,42389617
9 (25-07-14)	0,301786068	0,39416278
10 (25-07-14)	0,307539527	0,40167738

### 2.2.5. Precisão e Exactidão

#### 2.2.5.1. Precisão

A precisão de um método analítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas múltiplas de uma amostra. A precisão do método foi avaliada levando em consideração a repetibilidade e a precisão intermédia.

#### i. Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade analítica foram analisados 10 padrões com a mesma concentração. Usou-se o padrão de menor concentração e portanto mais perto do limite de detecção, o qual tendencialmente poderá apresentar um coeficiente de variação maior.

A repetibilidade é um parâmetro avaliado segundo 10 medições efectuadas no mesmo dia, analisando o seu erro relativo e o coeficiente de variação.

**Tabela 28:** Leituras obtidas experimentalmente no mesmo dia para o padrão de 0,2 mg/mL

nº ensaio - data	valor experimental (xi)	y (Aab/API)
1 (25-07-14)	0,352041	0,459801
2 (25-07-14)	0,392324	0,512415
3 (25-07-14)	0,320487	0,418588
4 (25-07-14)	0,324551	0,423896
5 (25-07-14)	0,301786	0,394163
6 (25-07-14)	0,375527	0,490476
7 (25-07-14)	0,356019	0,464996
8 (25-07-14)	0,351774	0,459452
9 (25-07-14)	0,336257	0,439185
10 (25-07-14)	0,307539	0,401677

O critério de aceitação para o coeficiente de variação estabelecido foi de  $CV < 10\%$ . Obteve-se  $CV = 8,5313\%$ . Como se pode observar, o coeficiente de variação obtido cumpre o critério e, portanto, pode-se afirmar que o método apresenta boa repetibilidade.

## ii. Precisão Intermédia

A avaliação da precisão intermédia pode ser efectuada em dias diferentes e/ou com analistas diferentes. Ao valor da precisão intermédia está associado um erro relativo.

A avaliação estatística realizou-se através da análise de 16 soluções padrão em dias diferentes. Estabeleceu-se para critério de aceitação que o erro relativo fosse inferior a 10%.

Na tabela seguinte apresentam-se os resultados analíticos correspondentes a dias diferentes com o mesmo analista.

**Tabela 29:** Leituras obtidas experimentalmente em dias diferentes para o padrão de 0,2 mg/mL

nº ensaio - data	valor experimental (xi)	y (Aab/API)
1 (03-06-14)	0,149159	0,1948170
2 (03-06-14)	0,144722	0,189022
3 (04-06-14)	0,150432	0,196479
4 (05-06-14)	0,156274	0,204109
5 (06-06-14)	0,142797	0,186507
6 (11-06-14)	0,183116	0,239168
7 (25-07-14)	0,352041	0,459801
8 (25-07-14)	0,392324	0,512415
9 (25-07-14)	0,320487	0,418588
10 (25-07-14)	0,324551	0,423896
11 (25-07-14)	0,301786	0,394163
12 (25-07-14)	0,375527	0,490476
13 (25-07-14)	0,356019	0,464996
14 (25-07-14)	0,351774	0,459452
15 (25-07-14)	0,336257	0,439185
16 (25-07-14)	0,307539	0,401677

O valor do erro relativo obtido foi de 9,043%. Como se pode observar, o valor para o erro relativo cumpre o critério e portanto pode-se afirmar que o método apresenta uma boa precisão.

#### 2.2.5.2.Exactidão

A exactidão pode ser avaliada a partir de ensaios de intercomparação laboratorial, materiais de referência certificados e ensaios de recuperação. Os ensaios de intercomparação laboratorial requerem a participação activa de mais do que um laboratório e estatisticamente só são conclusivos os resultados obtidos com pelo menos 5 laboratórios participantes. Em Portugal, não existem que tenhamos conhecimento, laboratórios que se dediquem à quantificação do ácido abiético na matriz em estudo.

Sempre que possível, em validação de métodos de ensaio, devem ser utilizados materiais de referência certificados (MRC), os quais constituem uma

excelente ferramenta o controlo externo de uma análise química. Do nosso conhecimento, não existem MRC para esta matriz.

Deste modo, num futuro próximo poder-se-ão realizar testes de recuperação para estudar a exactidão do método.

### 2.2.6. Resultados da Concentração de Ácido Abiético presente nas resinas em estudo

O ácido abiético é o componente principal da resina. Deste modo, e após o estudo realizado, demonstrado acima foi feito o cálculo da concentração das 12 amostras de resinas em estudo.

Estes resultados foram obtidos através da equação  $y = 1,3061x$  onde  $y$  é a média das 3 leituras para cada resina.

**Tabela 30:** Resultados da concentração de ácido abiético

Nº Amostra	leitura 1	leitura 2	leitura 3	[Abiético] <sub>final</sub> (mg/mL)
<b>R1</b>	0,684632625	0,664399802	0,621564	<b>0,55</b>
<b>R2</b>	0,997327081	0,949366731	0,903838	<b>0,77</b>
<b>R3</b>	0,830730919	0,975878155	0,923226	<b>0,74</b>
<b>R4</b>	0,394653359	0,410072612	0,383456	<b>0,36</b>
<b>R5</b>	1,249528119	1,19820175	1,138233	<b>0,95</b>
<b>R6</b>	0,479427767	0,47920327	0,520766	<b>0,43</b>
<b>R7</b>	0,737722162	0,71233384	0,657653	<b>0,59</b>
<b>R8</b>	1,564779296	1,349306217	1,321167	<b>1,11</b>
<b>R9</b>	0,194808313	0,167037954	0,19299	<b>0,21</b>
<b>R10</b>	0,42614939	0,44161038	0,42094	<b>0,39</b>
<b>R12</b>	0,35902634	0,31090421	0,34641	<b>0,32</b>
<b>R13</b>	0,31062982	0,27611114	0,28398	<b>0,28</b>





**Capítulo III**  
*Conclusão*

---







### 3. Conclusões

A colofónia é uma matéria-prima constituída essencialmente por ácidos resínicos do tipo abiético, largamente utilizada em diversos tipos de aplicações tal como o fabrico de adesivos ou colas. A caracterização e classificação da colofónia é muito importante para a indústria de transformação essencialmente por dois motivos, o controlo de qualidade da matéria-prima e a definição do tipo de aplicação.

Com o objectivo de utilizar métodos de análise que permitam a quantificação e identificação dos componentes da colofónia e que sejam de fácil aquisição pelos laboratórios de análise da indústria, desenvolveu-se uma metodologia de análise por GC-MS.

Em primeiro lugar foram avaliados diferentes tipos de derivatização de modo a garantir que a composição da colofónia não se modifica durante o processo de preparação da amostra, já que se trata de uma mistura com componentes muito sensíveis à exposição ao ar e à temperatura. Todas as amostras fornecidas pelas empresas portuguesas foram derivatizadas por reacção com diazometano, e guardadas em atmosfera de azoto a 0°C até a realização da análise.

O método cromatográfico desenvolvido permitiu a separação e observação de 22 componentes da colofónia. De entre eles, os cinco componentes principais, que representam aproximadamente 50% da amostra, foram identificados como ácido abiético, dehidroabiético, pimárico, isopimárico e sandarocopimárico através dos seus espectros de massa.

A análise hierárquica dos componentes e a análise de componentes principais, considerando 14 dos componentes da colofónia, permitiu classificar as amostras em relação ao país de origem.

Realizou-se ainda o estudo preliminar para a validação do método analítico para a análise quantitativa da concentração de ácido abiético na colofónia para o qual se determinaram os seguintes parâmetros: a selectividade, a especificidade, a linearidade, o limite de detecção, o limite de quantificação e a exactidão.





**Capítulo IV**  
*Experimental*

---







## 4. Experimental

### 4.1. Instrumentação

#### i. Micro-ondas

As reacções assistidas por micro-ondas foram realizadas no aparelho CEM Discover S-Class, com controlo constante de temperatura, pressão e da potência de micro-ondas.

#### ii. Espectroscopia de Ressonância Nuclear (RMN-<sup>1</sup>H)

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H foram registados à temperatura ambiente num espectrómetro Bruker Avance III, operando a 400 MHz. Os desvios químicos ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (J) são indicados em ppm e Hz, respectivamente. O clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) é utilizado como solvente e o padrão interno foi o tetrametilsilano (TMS).

#### iii. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrómetro de Massa

A análise por GC/MS foi efectuada num cromatógrafo HP – 6890A acoplado a um detector de massas (MS) HP5973 e equipado com uma coluna capilar HP-5MS (Agilent): 30 m; 0,25 ID; 1,0  $\mu$ m de fase estacionária imobilizada: 5% fenilo, 95% dimetilsilicone (Agilent).

### 4.2. Materiais

#### i. Reagentes

Todos os reagentes envolvidos neste trabalho experimental são produtos químicos de alto grau de pureza adquiridos comercialmente e foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

Foram utilizadas amostras de colofónia (forma sólida) cedidas por seis empresas portuguesas, ácido abiético (Fluka, 75%), Colesterol – C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>.COOH

(Aldrich, 95%), anidrido acético (Panreac, 99%), a trietilamina (Sigma Aldrich, 31-35%), o ácido oleico (BHD Chemicals Ltd, 65-70%), o sulfato de magnésio (Paul Lohmann) e o acetato de sódio anidro (Panreac, 99%).  $K_2CO_3$  (Panreac, 99%) é usado como base.

Foi ainda preparada uma solução saturada de bicarbonato de sódio.

## ii. Solventes

Solventes como o diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ), o éter etílico ( $C_4H_{10}O$ ), o tolueno ( $C_7H_8$ ), o metanol ( $CH_3OH$ ), etanol ( $C_2H_6O$ ), foram secos e purificados laboratorialmente segundo os procedimentos habituais. Quanto ao diclorometano foi refluxado na presença de cloreto de cálcio durante 3 horas e em seguida destilado. Em relação ao éter etílico e ao tolueno, estes foram refluxados na presença de sódio, usando benzofenona como indicador e em seguida são destilados. O etanol e o metanol foram aquecidos a refluxo durante 2 horas com magnésio (5 g/L) na presença de palhetas de iodo (0,5 g/L), seguindo-se a destilação a partir do alcóxido de sódio.

O clorofórmio deuterado (Sigma Aldrich, 99,8%) é utilizado como solvente na análise de espectros de RMN.

O iodeto de metilo (Sigma Aldrich, 99%), o t-butanol (Sigma Aldrich, 99,7%), o dimetilsulfóxido (Fisher Scientific, 99,98%), o ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich,  $\geq 99\%$ ), o ácido sulfúrico (Fisher Chemical,  $> 95\%$ ), foram outros dos solventes utilizados ao longo deste trabalho.

## iii. Outros

O controlo das reacções é efectuado por TLC. Para tal são necessárias placas de alumínio revestidas de sílica  $SiO_2$  60 800-20EA (Fluka).

Em algumas reacções foi necessário utilizar peneiros moleculares com o intuito de “retirar a água” das soluções.

### 4.3. Métodos

#### i. Método de GC-MS

A análise dos componentes da resina pode ser feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

A amostra foi injectada no modo de divisão à temperatura de 250 ° C. Os analitos foram separados por uma coluna capilar HP-5MS (30 mx 0,25 mm x 0,25 mm). A temperatura inicial da coluna foi de 70 ° C e, em seguida, aumentou 15 ° C / min até 250 ° C, foi mantida durante 10 min e, seguida de um aumento de 5 ° C / min até 290 ° C. O tempo total da corrida foi de 32 minutos.

O gás de arraste utilizado foi o hélio. Os espectros de massa foram obtidos com ionização por impacto de electrões (70 eV) e a aquisição de dados foi realizada em modo de varrimento, com uma gama de massa de  $m/z$  30 e 550. A temperatura da interface e da fonte de iões é de 200 ° C e 230 ° C, respectivamente.

- Preparação das Amostras

A preparação das amostras de resina a serem analisadas através deste método cromatográfico num GC-MS é realizada transformando as formas ácidas da colofónia nos seus ésteres correspondentes através da derivatização. Esta operação tem como objectivo o aumento da volatilidade dos compostos tornando assim a análise GC-MS muito mais eficaz. Foi utilizado como reagente de metilação o diazometano, dado ser muito eficaz na metilação de compostos com hidrogénios activos, como os ácidos carboxílicos que são metilados directamente.

- Análise Qualitativa e Quantitativa

A análise qualitativa e/ou quantitativa é feita através dos cromatogramas obtidos. O estudo qualitativo baseia-se na análise da fragmentação de cada composto em estudo e é confirmada recorrendo a soluções padrão.

A análise quantitativa foi efectuada através de uma curva de calibração. A calibração é um processo pelo qual a intensidade do pico cromatográfico (área) é relacionada com uma concentração conhecida.

A análise quantitativa do ácido abiético foi realizada a partir da preparação de uma solução padrão – mãe. A partir desta, foram preparados padrões com diferentes concentrações.

## ii. Método de preparação de diazometano

- Preparação de uma solução de Diazald num balão de destilação:

- Preparação de uma solução de KOH:  $\left. \begin{array}{l} - 1 \text{ g de KOH (Eka Chemicals)} \\ - 4 \text{ ml de H}_2\text{O} \\ - 40 \text{ ml de EtOH} \end{array} \right\}$

- Arrefecimento da solução de Diazald a 0°C adicionando muito lentamente a solução de KOH;

- Repousar durante 5 minutos;

- Destila-se a solução resultante num banho de água a 60-65°C e o erlenmeyer de recolha tem de estar imerso num banho de gelo e não possuir esmerilado;

- O que fica no balão é destruído com CaCl<sub>2</sub> (adicionar até ficar transparente);

- Quando estiver neutralizado adiciona-se água;

- Atenção: muito cuidado com o erlenmeyer do Diazometano e colocar no frigorífico;

- Recolhe-se aproximadamente 30 ml.

## Referências Bibliográficas

- [1] J. C. a. G. Hone, Gum naval stores: turpentine and rosin from pine resin, Rome: Natural Resources Institute, 1995.
- [2] Y. Gaillard, A Mija, A. Burr, E. Darque-Ceretti, E. Felder, N. Sbirrazuoli, “Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin,” *Thermochimica Acta*, vol. Volume 521, p. 90–97, 2011.
- [3] S. Sadhra, C. Gray, I. Foulds, “High-performance liquid chromatography of unmodified rosin and its applications in contact dermatology,” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. Volume 700, p. 101–110, 1997.
- [4] Dr. H. A. Boekenoogen, J. G. Cobler, A. Z. Connor, Dr. W. B. Crummet, Dr. Lloyd C., Chemical Analysis of Resin-Based Coating Materials, London: Interscience Publishers Ltd., 1959.
- [5] [Online]. Available: [http://www.ctb.com.pt/?page\\_id=7174](http://www.ctb.com.pt/?page_id=7174). [Acedido em 29 Outubro 2013].
- [6] W. W. Christie, “Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis,” em *Advances in Lipid Methodology*, Dundee, Oily Press, 1993, pp. 69-111.
- [7] J. C. Souto, P. Yustos, M. Ladero, “Disproportionation of rosin on an industrial Pd/C catalyst: Reaction pathway and kinetic model discrimination,” *Bioresource Technology*, vol. Volume 102, p. 3504–3511, 2011.
- [8] P.A. Botham, D. Lees, H. P. A. Illing, “On the skin sensitisation potential of rosin and oxidised rosin,” *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. Volume 52, p. 257–263, 2008.
- [9] M. Ladero, M. Garcia, J. J. Tamayo, I. L. Ahumada, F. Trujillo, F. Garcia-Ochoa, “Kinetic modelling of the esterification of rosin and glycerol: Application to industrial operation,” *Chemical Engineering Journal*, vol. Volume 169, p. 319–328, 2011.
- [10] C. M. O. Lopes, “Caracterização de resinas naturais e seus derivados por análise multivariada,” Aveiro, 2008.
- [11] A. T. Afonso, “Desenvolvimento Sustentável em Engenharia Mecânica Um caso de estudo: Projeto Autarkeia,” Porto, 2013.
- [12] P.M. Satturwar, S. V. Fulzele, J. Panyam, P. M. Mandaogade, D. R. Mundhada, B. B. Gogte, V. Labhasetwar, A. K. Dorle, “Evaluation of new rosin derivatives for pharmaceutical coating,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. Volume 270, p. 27–36, 2004.
- [13] J. Comyn, “Surface characterization of pentaerythritol rosin ester,” *International Journal of Adhesion and Adhesives*, vol. Volume 15, p. 9–14, 1995.
- [14] [Online]. Available: <http://www.absmaterial.com/>. [Acedido em 29 Julho 2014]

- [15] M. J. J. Mayer, J. Meuldjkk, D. Thoenes, Influence of Disproportionated Rosin Acid Soap on the Emulsion Polymerization Kinetics of Styrene, The Netherlands: Laboratory of Chemical Process Technology, Eindhoven University of Technology, P.O. Box 51 3, 5600 MB Eindhoven .
- [16] R. Lin, H. Li, H. Lang, J. Su, W. Huang, “Structure and characteristics of lipase-catalyzed rosin acid starch,” *Food Hydrocolloids*, pp. 1-8, 2014.
- [17] A. M. Atta, S. M. El-Saeed, R. K. Farag, “New vinyl ester resins based on rosin for coating applications,” *Reactive and Functional Polymers*, vol. Volume 66, p. 1596–1608, 2006.
- [18] P. A. Smith, D. R. Gardner, D. B. Drown, G. Downs, W. W. Jederberg, K. Still, “Detection of Resin Acid Compounds in Airborne Particulate Generated from Rosin Used as a Soldering Flux,” *American Industrial Hygiene Association Journal*, vol. 58, pp. 868-875, 1997.
- [19] J. M. McGuire, P. J. Powis, “Gas Chromatographic Analysis of Tall Oil Fractionation Products After Methylation with N,N-Dimethylformamide Dimethylacetal,” *Journal of Chromatographic Science* , vol. 36, pp. 104-108, 1998.
- [20] A. Ozaki, Y. Yamaguchi, T. Fujita, K. Kuroda, G. Endo, “Safety assessment of paper and board food packaging: Chemical analysis and genotoxicity of possible,” *Food Additives and Contaminants* , vol. 22, pp. 1053-1060, 2005.
- [21] K. Mitani, M. Fujioka, A. Uchida, H. Kataoka, “Analysis of Abietic Acid and Dehydroabietic Acid in Food Samples by in-tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatographic-Mass Spectrometry,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1146, pp. 61-66, 2007.
- [22] Y. Kumooka, “Analysis of rosin and modified rosin esters in adhesives by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS),” *Forensic Science International 176 (2008) 111–120*, vol. 176, pp. 111-120, 2008.
- [23] D. W. McMartin, K. M. Peru, J. V. Headley, M. Winkler, J. A. Gillies, “Evaluation of Liquid Chromatography-Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Selected Resin Acids in River Water,” *Journal of Chromatography A*, vol. 952, pp. 289-293, 2002.
- [24] K. Arimoto, D. F. Zinkel, “New Esterification Method for Resin Acids,” *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 59, pp. 166-168, 1982.
- [25] *Norma ISO/IEC 17025*.
- [26] *Guia Relacre nº13*, 2000.
- [27] *Guia Relacre nº3*, 1996.
- [28] *Guia Relacre nº7*, 1996.
- [29] *Guia Relacre nº9*, 1998.
- [30] *Eurochem Guide*, 1998.
- [31] [Online]. Available: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE\\_899\\_2003\\_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES). [Acedido em 30 Julho 2014].

- [32] A. D. Eaton, M. A. H Franson, Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, American Public Health Association, 2005.
- [33] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, Quality Assurance in Analytical Chemistry, Alemanha, 1995.
- [34] *Guidance for Industry*, 2001.
- [35] *Norma ISO 8466-1*.
- [36] *Norma ISO 8466-2*.
- [37] Johnson et. al, 1988.
- [38] J. N. Miller, J. C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, England: Prentice Hall, 1993.
- [39] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, Chemometrics: a textbook, Elsevier Science Publishers B. V., 1988.
- [40] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Princípios de Análise Instrumental, Bookman, 2002.
- [41] M. Ribani, c B. G. Bottoli, C. H Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F C. Melo, “Validação em Métodos Cromatográficos e Electroforéticos,” *Quimica Nova*, vol. 27, pp. 771-780, 2004.
- [42] L. Segovia-Martínez, A. Bouzas-Blanco, P. Campíns-Falcó, A. Seco-Torrecillas, “Improving detection limits for organotin compounds in several matrix water samples by derivatization-headspace-solid-phase microextraction and GC–MS,” *Talanta* , vol. 80, p. 1888–1893, 2010.
- [43] *Norma ISO 5725-2*.
- [44] *ASTM E 178*.
- [45] J.A.S. Almeida, L. M. S. Barbosa, A. A. C. C. Pais, S. J. Formosinho, “Improving hierarchical cluster analysis: A new method with outlier detection and automatic clustering,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* , vol. 87, pp. 208-217, 2007.