

OBTENCIÓN DE COLOFONIA Y TREMENTINA A PARTIR DE RESINA DE *Pinus patula*. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE RESINA Y COLOFONIA DE ACUERDO CON LAS NORMAS ASTM Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ABIÉTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

ANA MILENA ESPAÑA BURBANO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006**

OBTENCIÓN DE COLOFONIA Y TREMENTINA A PARTIR DE RESINA DE *Pinus patula*. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE RESINA Y COLOFONIA DE ACUERDO CON LAS NORMAS ASTM Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ABIÉTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

ANA MILENA ESPAÑA BURBANO

Trabajo de grado presentado para optar al título de Químico

**Director:
M. Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO C.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006**

Nota de Aceptación

Director

M. Sc. JOSÉ ANTONIO GALLO C

Jurado

Dr. FABIO A. CABEZAS F

Jurado

Qco. TANIA MILENA GUTIÉRREZ

Fecha de sustentación: Popayán, 28 de Febrero de 2006

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi familia.

Universidad del Cauca.

COLCIENCIAS y COOTRAFORD por la financiación del proyecto.

COOTRAFORD por su colaboración para la adquisición de las muestras.

Departamento de Química.

Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental (GIQA).

M. Sc José Antonio Gallo, por la gestión y colaboración para desarrollar el trabajo.

M. Sc Wayner Rivera, por su colaboración con el préstamo de equipos.

Qco. Rodrigo Sarria, por su valiosa colaboración en todas las etapas el trabajo.

Profesores del Departamento de Química.

Tecnólogos.

Compañeros, amigos.

CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 RESINA	18
2.2 COLOFONIA	19
2.3 Análisis de calidad de los productos	23
2.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la determinación de Ácido Abiético, con detección Ultravioleta (UV).	25
2.5 Otras Técnicas Analíticas para la determinación de ácido abiético	28
3. METODOLOGÍA	30
3.1 REACTIVOS E INSTRUMENTOS	30
3.2 TOMA DE MUESTRAS	31
3.3 DESTILACIÓN DE LA RESINA	31
3.4 PORCENTAJE DE HUMEDAD	32
3.5 PORCENTAJE DE IMPUREZAS	33

3.6 PARÁMETROS DE CALIDAD PARA RESINA Y COLOFONIA	33
3.6.1 Índice de saponificación para resina y colofonia	33
3.6.2 Índice de acidez para resina y colofonia	33
3.6.3 Punto de reblandecimiento de la colofonia	33
3.6.4 Materia insaponificable (MI) para resina y colofonia	33
3.7 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	35
3.7.1 Infrarrojo	35
3.7.2 Ultravioleta	35
3.8 CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ABIÉTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	35
3.8.1 Pruebas de solubilidad.	35
3.8.2 Preparación de las soluciones estándar.	35
3.8.3 Selección de la columna.	35
3.8.4 Selección de la temperatura de la columna.	35
3.8.5 Selección de la fase móvil.	35
3.8.6 Selección de la longitud de onda de trabajo.	36
3.8.7 Determinación del flujo óptimo.	36
3.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	36
3.9.1 Linealidad.	36
3.9.2 Sensibilidad	36
3.9.3 Precisión	36
3.9.4 Exactitud del método	36
3.10 Metodología de inyección de la muestra	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 DESTILACIÓN DE LA RESINA	38
4.2 DETERMINACIÓN DE LAS NORMAS DE CALIDAD	40
4.3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	41
4.3.1 Espectroscopía Infrarroja en Colofonia.	41
4.3.2 Espectroscopía ultravioleta para el Ácido Abiético.	43

4.4	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA	44
4.4.1	Evaluación de la solubilidad de colofonia	44
4.4.2	Selección de la columna	45
4.4.3	Optimización de la temperatura de la columna	46
4.4.4	Optimización de la fase móvil	47
4.4.5	Selección de la longitud de onda de trabajo	48
4.4.6	Determinación del flujo óptimo	51
4.4.7	Condiciones cromatográficas óptimas	51
4.5	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	52
4.5.1	Linealidad	52
4.5.2	Sensibilidad	54
4.5.3	Precisión	55
4.5.4	Exactitud del método	56
4.6	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA COLOFONIA OBTENIDA A PARTIR DE LA RESINA DE LA ESPECIE <i>Pinus patula</i> .	56
5.	CONCLUSIONES	60
6.	RECOMENDACIONES	61
7.	BIBLIOGRAFÍA	62
	ANEXOS	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales fuentes de resina de pino en el mundo	18
Tabla 2. Grados de colofonia y su clasificación de acuerdo con el color	23
Tabla 3. Parámetros de calidad de colofonias de diferentes países	24
Tabla 4. Indicadores de calidad para resina de <i>Pinus caribea</i>	24
Tabla 5. Indicadores de calidad para colofonia de <i>Pinus caribea</i>	25
Tabla 6. Indicadores de calidad para trementina de <i>Pinus caribea</i>	25
Tabla 7. Condiciones de análisis reportados por IPC-TM-650	26
Tabla 8. Reactivos utilizados durante el proceso	30
Tabla 9. Equipos utilizados en el proceso	30
Tabla 10. Parámetros obtenidos de la destilación por arrastre con vapor y la destilación simple	39
Tabla 11. Porcentajes de humedad de resina y colofonia. Porcentaje de impurezas de resina de <i>Pinus patula</i>	39
Tabla 12. Determinaciones de calidad en muestras frescas	40
Tabla 13. Determinaciones de calidad en muestras almacenadas	40
Tabla 14. Principales bandas del espectro IR en colofonia de <i>P. patula</i> y colofonia comercial	41
Tabla 15. Pruebas de solubilidad de colofonia de <i>Pinus patula</i> y colofonia comercial.	44
Tabla 16. Condiciones cromatográficas óptimas en HPLC	51

Tabla 17. Límite de detección para ácido abiético	54
Tabla 18. Datos para calcular intervalo de confianza.	54
Tabla 19. Límite de cuantificación para ácido abiético	54
Tabla 20. Datos de áreas y sus respectivas desviaciones estándar para ácido abiético	55
Tabla 21. Datos de reproducibilidad del método.	56
Tabla 22. Datos de exactitud del método de extracción	56
Tabla 23. Intervalo de confianza para Ácido abiético	57
Tabla 24. Concentración real de ácido abiético en colofonia de <i>Pinus patula</i> y comercial	58

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Muestras de colofonia	20
Figura 2. Ejemplos de Ácidos de los tipos Abiético y Pimárico	20
Figura 3. Cromatograma de los ácidos dehidroabiético, neoabiético y abiético a 220 nm	27
Figura 4. Cromatograma de los ácidos dehidroabiético, neoabiético y abiético a 240 nm	27
Figura 5. Diagrama de flujo para la destilación de resina	31
Figura 6. Montaje de destilación simple de resina	32
Figura 7. Diagrama para la determinación del contenido de MI en resina y colofonia	34
Figura 8. Montaje de destilación de resina por arrastre con vapor	38
Figura 9. Espectro infrarrojo de colofonia de <i>P. Patula</i>	42
Figura 10. Espectro infrarrojo de colofonia comercial.	43
Figura 11. Espectro UV de ácido abiético.	44
Figura 12. Cromatograma del ácido abiético. Columna SGE Octyl 5um 250 x 4 mm. Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	45
Figura 13. Cromatograma de ácido abiético. 24°C. Columna Bondapack C ₁₈ . Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	46
Figura 14. Cromatograma de ácido abiético. 40°C. Columna Bondapack C ₁₈ . Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	46
Figura 15. Cromatograma de ácido abiético. 60°C. Columna Bondapack C ₁₈ . Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	47
Figura 16. Cromatograma de colofonia comercial. Columna Bondapack C ₁₈ . 60-°C. Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	48

Figura 17. Cromatograma de ácido abiético. 220 nm. Columna Bondapack C ₁₈ . 60-°C. Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	48
Figura 18. Cromatograma de ácido abiético. 241 nm. Columna Bondapack C ₁₈ . 60-°C. Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	49
Figura 19. Cromatograma del ácido abiético a 250 nm. Columna Bondapack C ₁₈ . 60-°C. Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	49
Figura 20. Cromatograma del ácido abiético a 276 nm. Columna Bondapack C ₁₈ . 60-°C. Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	50
Figura 21. Cromatograma del ácido abiético a 298 nm. Columna Bondapack C ₁₈ . 60-°C. Fase móvil ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)	50
Figura 22. Curva de Van Deemter para determinar flujo óptimo	51
Figura 23. Cromatograma de ácido abiético 1000 ppm en condiciones óptimas	52
Figura 24. Curva de calibración para ácido abiético en un rango de 1–10 ppm	52
Figura 25. Curva de calibración para ácido abiético en un rango de 10 – 100 ppm	53
Figura 26. Curva de calibración para ácido abiético en un rango de 100–1000 ppm	53
Figura 27. Cromatograma de muestra de colofonia de <i>Pinus patula</i>	57
Figura 28. Cromatograma de muestra de colofonia comercial	58

LISTA DE SIGLAS

ACN: Acetonitrilo

AEPT: Altura Equivalente de Plato Teórico.

ASTM: American Society for Testing and Materials.

CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

FID: Detector de Ionización de llama

GIQA: Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental.

GR: Grado reactivo.

HPLC: High Performnace liquid Chromatography

IPC: The Intitute for Interconnecting and Packaging Electronic Circuit.

IR: Infrarrojo.

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

MI: Materia Insaponificable

OSHA: Occupational Safety and Health Administration

PFNM: Productos Forestales no Maderables.

PIE: Placa de instalación eléctrica

RSD: Desviación estándar relativa.

UV: Ultravioleta

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. ECUACIONES PARA ANÁLISIS DE CALIDAD DE RESINA Y COLOFONIA	67
1) Determinación del Porcentaje de Humedad para Resina	67
2) Índice de saponificación (IS)	67
3) Índice de Acidez (IA)	67
4) Contenido de Materia Insaponificable (MI) ¹	68
ANEXO B. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	69
1) LINEALIDAD	69
2) SENSIBILIDAD	69
3) PRECISIÓN	70
4) EXACTITUD	71
ANEXO C. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA FASE MÓVIL	72
Figura 1. Cromatograma de colofonia comercial. ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (70:30:0.1)	72
Figura 2. Cromatograma de colofonia comercial. ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (80:20:0.1)	72

RESUMEN

Los registros de Productos Forestales no Maderables (PFNM) comprenden una gran variedad de materiales, sustancias y materias primas como corteza, follaje, aserrín, destacando en primer lugar por su cantidad aprovechada, la resina de pino.

La resina fluye naturalmente o por incisión del tronco de algunas especies de los géneros *Pinus* y *Abies*, de la cual y mediante destilación se obtiene breya o colofonia y trementina o aguarrás. La resina, la colofonia y la trementina presentan amplia aplicación industrial. De su calidad depende la comercialización y utilización de los mismos.

Este trabajo se basa en conocer las propiedades que presentan la resina y colofonia de la especie *Pinus patula*, para evaluar su calidad, la cual está determinada en primer lugar, por el rendimiento obtenido de colofonia y trementina a partir de la destilación de la resina, y en segundo lugar, mediante los análisis de calidad tanto de la resina, como de los subproductos (trementina y colofonia) de acuerdo con las Normas Internacionales ASTM (American Society for Testing and Materials) para las siguientes determinaciones: porcentaje de humedad, índice de acidez, índice de saponificación y material insaponificable. Otras pruebas de calidad realizadas para colofonia son la determinación del color y del punto de reblandecimiento. Las pruebas de calidad en este estudio se realizarán sólo en resina y colofonia, debido a la importancia que tiene la colofonia a nivel comercial.

Finalmente, se implementó una metodología para la cuantificación de ácido abiético mediante la técnica analítica Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

INTRODUCCIÓN

Por lo general, cuando se habla de bosques y selvas se piensa sólo en árboles y en la madera que de ellos se extrae. Esta visión, herencia de una forma errónea de ver la naturaleza y de los viejos modelos "extractivos" de explotación de los recursos naturales, deja de lado a la mayoría de las especies animales y vegetales que, junto con los árboles, constituyen lo que se conoce como *ecosistemas forestales* o *de selvas*.

En dichos ecosistemas existe un sinnúmero de plantas y animales que, asociados con los árboles de valor comercial reconocido o "maderables", aportan numerosos bienes y servicios: productos alimenticios, forrajes, materiales para curación, construcción, retención de agua, captura de carbono, extracción de materias primas y "principios activos", o simplemente como refugio de otras especies. Todos estos organismos forman parte de complejas redes de relaciones biológicas, que crean las condiciones necesarias para el equilibrio y la preservación de los ecosistemas forestales en bosques, selvas y semidesiertos.

Una gran cantidad de especies se comercializan en mercados regionales y una aún relativamente pequeña cantidad de ellas han pasado a venderse en circuitos nacionales e inclusive internacionales. Esto último, en el caso de algunos medicamentos, principios activos, entre otros.

Es a esta amplia gama de individuos animales y vegetales, y a los bienes e insumos que se extraen de ellos, y que forman parte de los ciclos productivos, alimenticios, religiosos y culturales de los pueblos rurales, a lo que denominamos genéricamente PFNM¹.

Hasta el momento, los cultivos de pino existentes en la región solamente se emplean para la obtención de madera y papel. Tal vez el desconocimiento de otras cualidades de estas especies, sea la causa por la cual no sean aprovechados de una manera más integral. Es aquí donde el papel del Químico juega un papel muy importante, puesto que se requieren técnicas de análisis especializadas que permitan dar a conocer las características de los PFNM, para encaminar su utilidad.

La presente investigación se basa en el análisis de la resina de pino, uno de los principales PFNM, y de colofonia, la cual es obtenida a partir de ella. La resina es sólo uno de los múltiples PFNM derivados de los bosques de coníferas, especialmente del género *Pinus*, cuya extracción es una práctica que es realizada en Colombia en una mínima proporción, teniendo en cuenta las grandes extensiones de tierra que contienen dichos cultivos. La resinación es una actividad forestal que tiene por objeto la extracción de resina que fluye de los pinos durante el año.

En este trabajo se presenta la optimización del proceso de destilación de la resina, para obtener una fracción condensada de trementina y otra de colofonia como residuo, mostrando variables que van desde el montaje, hasta cambios en la temperatura de destilación para mejorar los porcentajes de rendimiento.

Los análisis de calidad para resina y colofonia se realizaron teniendo en cuenta las normas internacionales ASTM; entre ellas están: contenido de humedad, materia insaponificable, e índices de acidez y saponificación. También se determinó el punto de reblandecimiento y el grado de color de la colofonia.

La técnica analítica utilizada para la determinación del ácido abiético, fue Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección Ultravioleta, mediante curva de calibración.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener colofonia y trementina mediante destilación de la resina de la especie *Pinus patula*, a nivel de laboratorio y posterior determinación de ácido abiético en colofonia, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, como técnica analítica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1 Optimizar el proceso de destilación de la resina a nivel de laboratorio.

1.2.2 Realizar pruebas de calidad a la resina y colofonia como: contenido de humedad, materia insaponificable, índices de saponificación y acidez, basadas en las normas ASTM.

1.2.3 Determinar el contenido de impurezas de la resina y el punto de reblandecimiento de la colofonia.

1.2.4 Evaluar la calidad de resina y colofonia de acuerdo con los resultados obtenidos.

1.2.5 Implementar una metodología que permita la determinación del ácido abiético en colofonia por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

1. MARCO TEÓRICO

2.1 RESINA

La resina cruda u oleorresina, es obtenida por extracción de los árboles de pino vivos, es densa, pegajosa, opaca y de coloración lechosa. Inevitablemente, presenta una cierta cantidad de escombros del bosque (insectos, corteza, etc.) cuando es recogida de los árboles. Las especies principales de las cuales es actualmente extraída se encuentran en la tabla 1^{2,3}.

Tabla 1. Principales fuentes de resina de pino en el mundo

Especie	País productor
<i>Pinus elliottii</i> Engelm.	Brasil, Argentina, Sudáfrica, (USA, Kenya)
<i>P. massoniana</i> D. Don	Republica de China
<i>P. kesiya</i> Royale ex Gordon	Republica de China
<i>P. pinaster</i> Aiton	Portugal
<i>P. merkusii</i> Jungh. & Vriese	Indonesia, (Viet Nam)
<i>P. roxburghii</i> Sarg.	India, (Pakistan)
<i>P. oocarpa</i> Schiede	México, Honduras
<i>P. caribaea</i> Morelet	Venezuela, (Sur Africa, Kenya), América central
<i>P. sylvestris</i> L.	Rusia
<i>P. halepensis</i> Miller	Grecia
<i>P. radiata</i> D. Don	(Kenya)

La oleorresina se forma en el interior de las células parenquimatosas, de delgadas paredes, en las capas externas de la albura junto a la corteza. Esas células productoras de resina, uniéndose unas con otras, forman conductos horizontales y verticales que permiten el paso de la resina. Al sufrir daño natural o artificial (incisiones en la corteza penetrantes en la albura), la oleorresina exuda por la herida. Las células la producen durante los meses de crecimiento del árbol y permanecen vivas y productivas varios años, si se utilizan apropiados métodos de incisión y otras prácticas estimulantes. La oleorresina no es la savia del pino, la cual es una solución acuosa que es transportada en la albura por las traqueidas, células verticalmente extendidas, derivadas del cámbium del pino.

Cada año, una porción de las células parenquimatosas más viejas de las capas internas de la albura se impregnan con resina y dejan de funcionar. Éste es el proceso de transformación de la albura en duramen, el cual sirve como soporte del árbol, aumenta en tamaño al envejecer y su contenido de resina se hace mayor que el de la albura.

En la actualidad la resina se utiliza en la fabricación de ceras, pinturas, jabones, adhesivos y productos farmacéuticos, entre otros. La industria comprende a todos aquellos productos obtenidos de la resina de los árboles de pino y sus derivados primarios colofonia y trementina. Históricamente la resina ha sido considerada como el PFNM de mayor importancia económica⁴.

En Cuba la resina de pino tiene tres destinos básicos:

- Resina cruda para exportación (800 toneladas al año).
- Consumo directo como encolantes en la industria del papel (200 toneladas por año).
- Destilación en plantas artesanales o industriales, mediante la tecnología de separación por vapor de los componentes de la resina: colofonia, aceite de trementina y agua.

En las plantas artesanales el vapor requerido en el proceso se genera a partir de leña y carbón, por ello, la eficiencia es inferior al de las plantas industriales. En estas plantas se obtiene un 60-63% de colofonia y un 11-12% de aceite de trementina. Teóricamente, en las plantas industriales se espera obtener los resultados siguientes: Colofonia 70-75 % y aceite de trementina 15%⁵.

2.2 COLOFONIA

La colofonia, denominada también rosina, es el principal producto obtenido de la resina de pino. Ésta permanece como residuo no volátil después de la destilación de la trementina. Es un sólido vidrioso, cristalino y frágil. Es insoluble en agua pero soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Es clasificada y vendida con base en el color, siendo la de mejor calidad el amarillo-marrón de matiz pálido. Algunas características fisicoquímicas influyen en el criterio de calidad dependiendo principalmente de la especie de pino, aunque también influye la época del año en la que se extrae la resina y la edad del árbol⁶. En la figura 1 se pueden observar algunas muestras de colofonia.

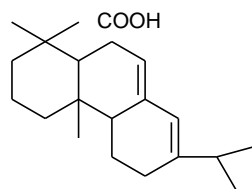
Figura 1. Muestras de colofonia



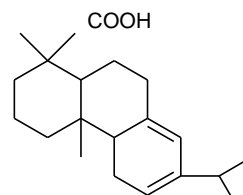
2.2.1 Composición: La colofonia obtenida tanto de resina, como de la madera de tocones de pino, está compuesta aproximadamente de 90% de ácidos resínicos y 10% de materia no ácida. Los ácidos resínicos son ácidos monocarboxílicos de alquilhidrofenantrenos, de los tipos pimárico y abiético (véase figura 2).

Figura 2. Ejemplos de Ácidos de los tipos Abiético y Pimárico

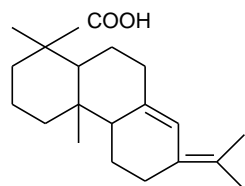
TIPO ABIÉTICO



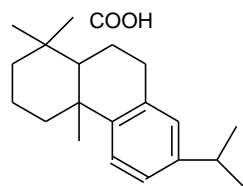
ÁCIDO ABIÉTICO
 $\lambda = 241 \text{ nm}$



ÁCIDO LEVOPIMÁRICO
 $\lambda = 272 \text{ nm}$

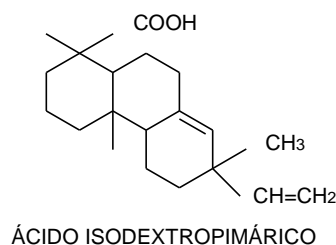
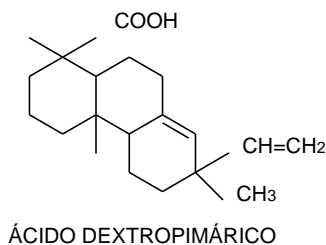


ÁCIDO NEOABIÉTICO
 $\lambda = 250 \text{ nm}$



ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO
 $\lambda = 276 \text{ nm}$

TIPO PIMÁRICO



La colofonia se usa a veces tal como se extrae y entonces se llama *colofonia sin modificar*. Para aumentar su estabilidad y mejorar sus propiedades físicas, recibe tratamiento químico, como hidrogenación, desproporcionamiento, polimerización, entre otros, los cuales modifican la configuración nuclear de la colofonia y sus productos se llaman *colofonias modificadas*. Las colofonias sin modificar y modificadas se convierten en derivados de ácidos carboxílicos. Estos derivados de colofonia y las colofonias modificadas tienen ahora mayor importancia industrial que la colofonia sin modificar.

Son tres los métodos importantes de obtención industrial de colofonia: la extracción con disolvente de la madera de tocones de pino, la incisión del árbol vivo y la separación a partir del aceite de resina.

2.2.2 Usos de las colofonias no modificadas. Los avances tecnológicos realizados en el siglo XX en el uso de estas colofonias se aprecia al examinar la colección de artículos sobre colofonia publicados por la American Society for Testing Materials ASTM. La colofonia sin modificar se usó extensamente en las industrias de tintas tipográficas, linóleo, barnices, aislamiento eléctrico, fundiciones, aceites para núcleos de vaciado, cuero, fósforos, adhesivos, construcción, fundentes y papel cazamoscas. En algunos casos, no era muy adecuada para estas aplicaciones por tres propiedades: la tendencia a cristalizar de los disolventes empleados, la oxidación por el oxígeno atmosférico a causa de su instauración y la reacción con sales de metales pesados como en los barnices. En la mayoría de los casos las pérdidas por cristalización y reacción con las sales de metales pesados, conocidas en la industria como "higadización" o "hepatización" y la coloración causada por oxidación se toleraban por dos motivos: no se conocían los métodos para evitarlas y la colofonia ofrecía otras propiedades cuya ventaja deseaba el consumidor.

Sin embargo, en las aplicaciones actuales se han eliminado muchas dificultades por el desarrollo de procesos que producen colofonias modificadas y sus derivados. Estos últimos son hoy la fuente principal del consumo en gran volumen de colofonia sin modificar en la manufactura de aprestos para papel, resinas sintéticas y barnices.

Por esta razón los usos actuales de la colofonia sin modificar son pocos y en volumen relativamente sin importancia. Los más importantes se mencionan aquí brevemente. Por sus buenas propiedades de aislamiento eléctrico, la colofonia se usa en muchas formulas aislantes y para encapsulamiento, sola para ciertos tipos de bobinas y en mezcla con asfalto, cera de abeja o laca, para impregnar el aislamiento textil de otros productos.

Su uso en aceites para impregnar cables eléctricos de alta tensión es importante y antiguo. Uno de los componentes esenciales en la producción de linóleo es el "cemento" compuesto por un aceite de linaza muy oxidado, colofonia y otras resinas, como las fenólicas modificadas. La colofonia actúa principalmente como pectizador o disolvente del aceite de linaza oxidado y es indispensable para comunicar al cemento las siguientes propiedades: sensibilidad térmica, tiempo de maduración satisfactorio y estabilidad en el envejecimiento. Las colofonias modificadas no son apropiadas para este uso.

La colofonia sin modificar es aproximadamente 40% de la sustancia aglutinante en los aceites para núcleos de fundición. En esta aplicación, la colofonia rellena los poros del núcleo y favorece la conservación de la forma al enfriarse el núcleo después de cocido. En las tintas tipográficas, la colofonia sin modificar se usa con aceites secantes y no secantes, según el tipo de la tinta que se prepara, para variar el cuerpo, la adhesividad, viscosidad, humectación del pigmento y penetración. Plastificada con aceites no secantes, la colofonia se vuelve muy adherente a la mayoría de las superficies, Este producto es adecuado para adhesivos del papel cazamoscas, fórmulas para vendar árboles, fórmulas de calafateo y de adhesivos especiales.

Muchas fórmulas para soldar contienen colofonia, y en ellas sirve como sustancia débilmente ácida para eliminar películas de óxido y atacar ligeramente la superficie metálica. La colofonia mezclada con vaselina se usa como fundente de soldadura en pasta.

La colofonia se usa en muchas fórmulas de moldeo de termoplásticos, como el aglutinante para cabezas de muñecos y fichas de póker. También se usa en lacres, punteras y plantillas de zapatos, cierres de baterías y latas, cementos para cuchillería y otros muchos termoplásticos,

Se ha descrito un depilatorio compuesto por 88 a 93% de colofonia sin modificar fundida con 7-12% de aceite de semilla de algodón. El producto se fabrica como material termoplástico para eliminar de las canales y las cabezas de los cerdos el pelo y las raíces que quedan después de las operaciones en las máquinas de depilación ordinarias⁷.

2.2.3 Usos de las colofonias modificadas. La mayoría de la colofonia es utilizada en forma de colofonia modificada químicamente. Sus usos más

importantes son: manufactura de adhesivos, tinta para imprenta, materiales aislantes para la industria electrónica, goma sintética, goma de mascar, neumáticos, pinturas, jabones y detergentes^{8,9}.

En la industria óptica, la colofonia es empleada como soporte de pulimento, cementos ópticos y colas de precisión¹⁰.

En el campo de la electrónica se utiliza como fundente o como pasta para soldadura, con una aleación metálica micronizada (normalmente de 20 a 45 micras para calidades de aplicación en electrónica). Los metales empleados para dichas aleaciones son estaño, plomo y plata. De esta forma, sirve para crear conexiones eléctricas y fijar mecánicamente componentes de montaje superficial sobre placas de circuitos^{11,12}.

La colofonia se usa también como agente formador de película en combinación con etanol y propilenglicol, para obtener laca fluorada para uso dental¹³. Cuando se hidrogena con pentaeritritol, se utiliza como recubrimiento en pinturas decorativas y de protección industrial¹⁴. Como adhesivo, la colofonia puede ser tratada de diversas formas: colofonia estabilizada esterificada con glicerina, penta, ésteres de glicol o polialcoholes¹⁵.

2.3 Análisis de calidad de los productos

Aunque existen varios criterios que determinan la calidad y aceptabilidad de la colofonia para las diferentes aplicaciones, el color y punto de reblandecimiento son normalmente indicadores suficientes de calidad. La colofonia se gradúa en base al color, el más pálido, siendo el más deseable, es designado como WW (water-white). Este grado y el ligeramente más bajo, WG (window-glass), son las colofonias más comercializadas. Un grado superior (X), en algunas ocasiones es también comercializado. Las calidades más oscuras son N, M, K, I y H. En la tabla 2, se muestran las clasificaciones colorimétricas, con la descripción del color correspondiente.

Tabla 2. Grados de colofonia y su clasificación de acuerdo con el color

Grado	X	WW	WG	N	M	K	I
Color	Amarillo pálido	Amarillo claro	Amarillo	Amarillo intenso	Amarillo marrón	Amarillo rojizo	Café rojizo

El punto en el cual la colofonia “se ablanda” cuando se somete al calor es llamado punto de reblandecimiento (en lugar de punto fusión). Se han encontrado colofonias con puntos de reblandecimiento en el rango entre 70-80°C. Sin embargo, colofonias con puntos de reblandecimiento mayores representan mejores calidades.

Debido a que la colofonia es un material ácido y la fabricación de derivados depende de su funcionalidad ácida, índices de acidez y de saponificación altos son también indicativos de una buena calidad. El contenido de materia insaponificable indica la cantidad de material no ácido en la colofonia. Valores por encima de 10, indican una pobre calidad del producto.

No hay ninguna norma internacional para colofonia, y aunque las ASTM describen los métodos estándar de análisis, no estipula ninguna especificación para calidades de colofonia. Los cuerpos de control de algunos países productores proporcionan las especificaciones pero, inevitablemente, las compañías y comerciantes involucrados en la industria de la colofonia tienen sus propias especificaciones, variando de una a otra compañía y dificultando la realización de normas o estándares de calidad de los productos^{16,17}.

La tabla 3 presenta algunas especificaciones para colofonia de orígenes diferentes y puede usarse como una guía para evaluar la aceptabilidad de colofonia.

Tabla 3. Parámetros de calidad de colofonias de diferentes países

Origen	Color	Punto Reblandecimiento	Índice Acidez	Índice Saponificación	Materia Insaponificable
China	WW	70-85	162-175		Máx. 7.5
Portugal	WW	Min 70	165-171	171-177	4.3-5.5
Brasil	X/W	70-78	155-170	165-185	Máx. 10
Indonesia	WW/WG	75-78	160-200	170-210	

Por su parte, en la Universidad de Pinar del Río, se han realizado análisis de calidad para la resina de *Pinus caribea* y sus componentes con resultados excelentes, pues los indicadores de acidez, saponificación y humedad están dentro del rango permisible para una resina con esta categoría. Los resultados de la destilación demostraron que la colofonia se encuentra entre un 64-70% mientras que la esencia de trementina está entre un 16-20%.

Para determinar los indicadores de calidad de la resina y sus componentes se utilizaron las Normas Internacionales ASTM, TAPPI y las Normas Cubanas^{18,19}. Los resultados se encuentran en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Indicadores de calidad para resina de *Pinus caribea*

Muestra	Índice Acidez	Índice Saponificación.	Material Insaponificable.	Humedad (%)	Impurezas(%)
Resina	140-145	144-148	37%	2.01-3.4	0.2-0.5

Tabla 5. Indicadores de calidad para colofonia de *Pinus caribea*

Muestra	Índice Acidez	Índice Saponificación	Material Insaponificable.	P. fusión	Humedad (%)
Colofonia	165-171	168-175	4.15-4.2	70-79 °C	0.01-0.03

Tabla 6. Indicadores de calidad para trementina de *Pinus caribea*

Muestra	Índice Acidez	Índice Ester	Índice Refracción	Densidad (g/mL)
Trementina	0.36	0.27	1.468	0.865

2.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la determinación de Ácido Abiético, con detección Ultravioleta (UV).

Es incuestionable que la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general²⁰.

El Detector Ultravioleta es uno de los detectores más frecuentemente empleados, tiene respuesta prácticamente universal, si se considera un amplio rango de longitudes de onda (190-800 nm). Por lo tanto, es aplicable a algunos compuestos presentes en la colofonia como los ácidos abiético, neoabiético, dehidroabiético, entre otros, los cuales presentan absorción aproximadamente entre 230-380 nm.

Debido a su alta eficiencia, la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es a menudo usada para determinar mezclas orgánicas complejas. Las técnicas cromatográficas han sido aplicadas a lo largo del tiempo para el estudio de compuestos naturales usados como soporte para aplicaciones arqueológicas y artísticas. Es así como desde 1988, la Universidad de Avignon (Francia), ha analizado algunos compuestos encontrados en sustancias resinosas usando esta técnica, con lo cual se puede garantizar la efectividad de la CLAR para la determinación de ácido abiético. El equipo CLAR utilizado tiene una bomba ternaria, la detección UV fue hecha con un detector de serie de fotodiodos Water 991. La inyección de las muestras fue llevada a cabo después de la extracción en metanol (grado HPLC), usando un baño ultrasónico por 10 minutos, y después de pasar la muestra por un filtro (DynarGard 0,2 µm). El solvente de elusión fue hecho de una mezcla binaria de agua y metanol, a un flujo de 0.6 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron de la siguiente manera: el solvente inicial fue una

mezcla de agua (80%) y metanol (20%); el volumen de metanol fue incrementado linealmente hasta 100% en 50 minutos. Luego, un período isocrático (100% m de metanol) hasta alcanzar la separación. También se realizaron análisis de ácidos resínicos usando un detector de arreglo de diodos Waters 996 y un detector fluorimétrico Waters 471²¹.

Por otro lado, the Intitute for Interconnecting and Packaging Electronic Circuit (IPC) reporta un análisis de residuos de colofonia en placas de instalaciones eléctricas (PIE) mediante CLAR con detección UV, para determinar sus principales componentes. Las condiciones del análisis se reportan en la tabla 7. La metodología de extracción se hizo de la siguiente forma:

- a) Registrar el área de la PIE (ancho x alto x 2).
- b) Colocar la PIE en un cartucho de extracción.
- c) Preparar una solución 75/25 (volumen) de 2-propanol/H₂O para la extracción.
- d) Adicionar 75-200 mL de la solución anterior al cartucho de extracción, de tal forma que cubra completamente la PIE.
- e) Sellar el cartucho y colocarlo en un baño de agua a 80-°C ± 5-°C por 1 hora (hacer un agujero en el cartucho).
- f) Concentrar el extracto hasta obtener aproximadamente 100 mL. Diluir con la solución 2-propanol/H₂O.
- g) Hacer un blanco.
- h) Realizar el análisis tanto para el blanco como para la muestra.

Tabla 7. Condiciones de análisis reportados por IPC-TM-650

Longitud de onda	220 y 240 nm
Columna	Novapack C ₁₈
Temperatura de la columna	60 -°C
Fase móvil	Acetonitrilo/Agua/ 60/40 25 milimolar Na ₂ PO ₄ H ₂ O
Flujo	2 mL/min
Volumen de muestra	10uL

Los cromatogramas obtenidos (véase figuras 3 y 4), muestran buenos resultados de separación de los ácidos dehidroabiético, neoabiético y abiético²².

Figura 3. Cromatograma los de ácidos dehidroabiético, neoabiético y abiético a 220 nm

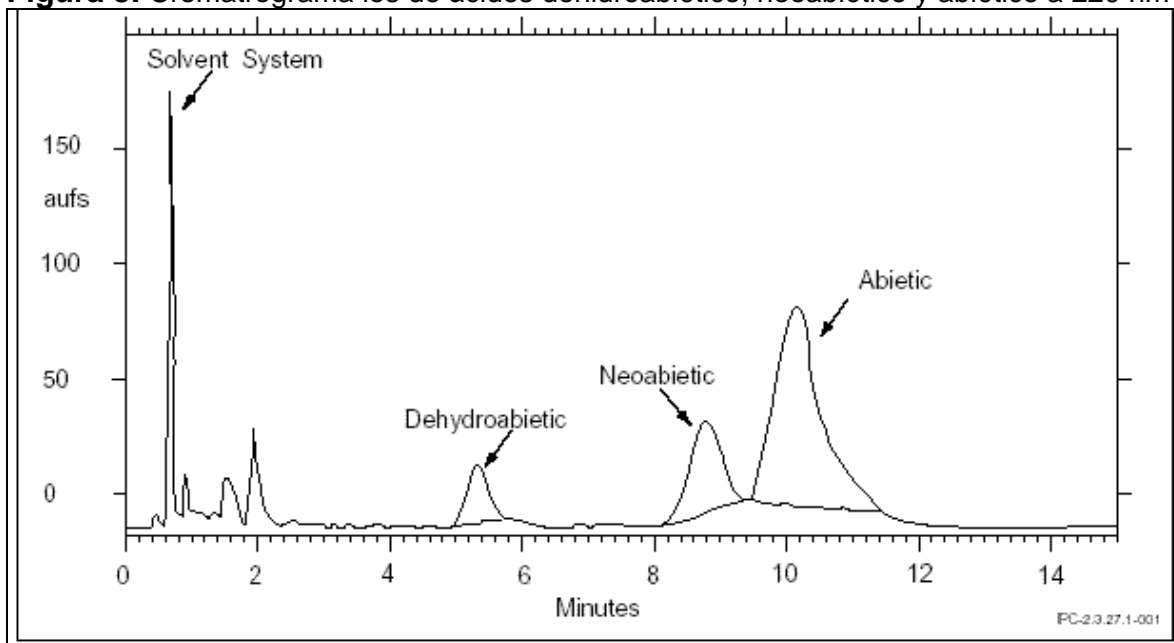
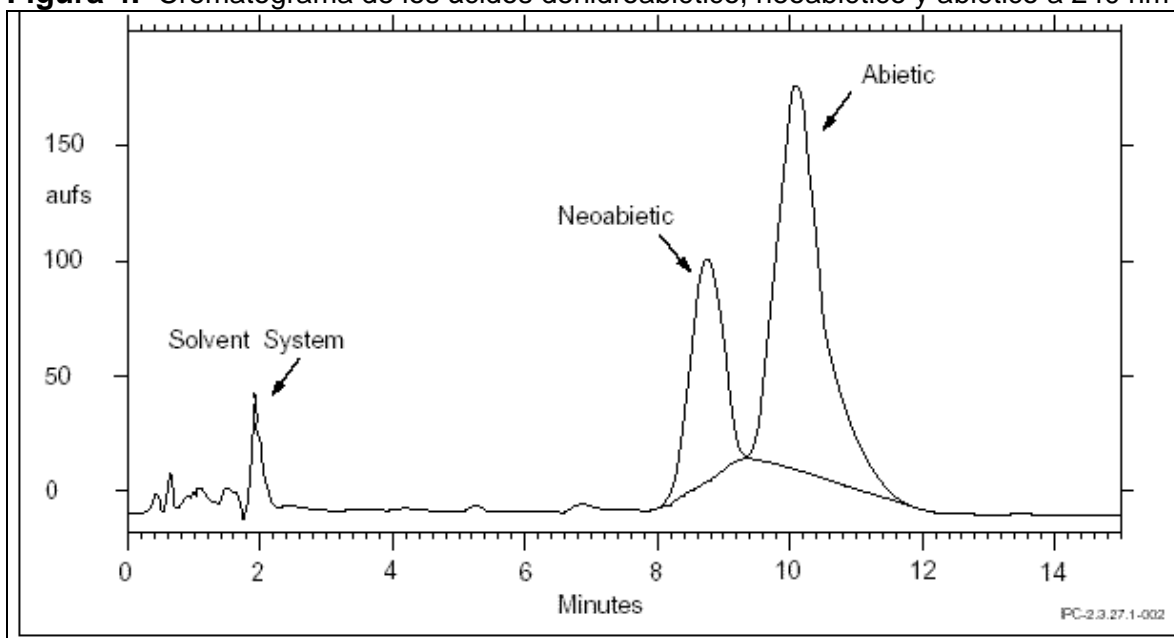


Figura 4. Cromatograma de los ácidos dehidroabiético, neoabiético y abiético a 240 nm



La OSHA (Occupational Safety and Health Administration), también reporta las siguientes condiciones para el análisis del ácido abiético: Columna C₁₈, fase móvil acetronitrilo/agua/ácido fosfórico 60/40/0.1 y una longitud de onda de 254 nm²³.

2.5 Otras Técnicas Analíticas para la determinación de ácido abiético.

- *Determinación por CLAR e identificación mediante Espectrometría de Masas de los ácidos dehidroabiético y abiético en propóleo.* Se empleó una columna C₁₈, la fase móvil fue metanol/agua 87:13, con 0.05% de ácido fórmico. El ácido abiético fue analizado por detección espectrofotométrica a 238 nm, y el ácido dehidroabiético fue detectado mediante un detector de fluorescencia. La espectrometría de masas fue usada para la identificación de los ácidos estudiados²⁴.

- *Identificación de ácidos resínicos en colofonia por Cromatografía de Gases.* Las ASTM presentan un método para la determinación de ácidos resínicos en colofonia de madera, en gomas o en aceites de pino mediante dicha técnica. La muestra es convertida a una sal de tetrametilamonio o puede ser esterificada con diazometano. La columna fue EGSS-X, y su temperatura fue de 200-°C, el gas portador fue nitrógeno y se utilizó un detector FID. Las temperaturas del puerto de inyección y del detector fueron 275-300 y 285-°C, respectivamente. De esta manera se logró la identificación de distintos ácidos resínicos metilados, como abietato, dehidroabietato, pimarato, entre otros²⁵.

- *Componentes de colofonia identificados en pañales.* Karlberg y Magnusson reportan un estudio sobre alérgenos de colofonia en pañales usando Cromatografía de gases, para detectar los principales componentes de la rosina: ácido abiético, ácido dehidroabiético y también los productos de oxidación, ácido 7-oxodehidroabiético. Para la extracción, los pañales se dividieron en tres partes: la cubierta trasera (incluyendo el pegante), la pelusa y la capa superior (incluyendo cubierta y pegante). Los extractos de acetona fueron realizados de la siguiente forma: se pesaron aproximadamente 2.5 g de la capa superior y 12.5 g de pelusa, cortado en trozos pequeños. Se adicionaron 100 mL de acetona y luego la mezcla se colocó en ultrasonido por 10 minutos. Se decantó el solvente y se repitió la extracción con 100 mL de acetona. Los 2 extractos fueron agrupados y concentrados a sequedad. Finalmente, los concentrados fueron guardados bajo nitrógeno. Previo al análisis, los extractos fueron metilados con diazometano. Se empleó una columna de sílica fundida HP-1, con una temperatura de 35-°C. La temperatura del detector fue de 250-°C, usando nitrógeno como fase móvil, con un flujo de 1.96 mL/min²⁶.

- *Cromatografía Líquida de Alta Resolución de colofonia no modificada y sus aplicaciones en dermatología.* La colofonia es un sensibilizador de la piel muy reconocido y también está entre las causas más comunes de asma ocupacional.

Debido a su compleja composición química, se dificulta aislar sus principales componentes, lo cual ha impedido el progreso en la identificación de los alérgenos específicos. Éste artículo reporta la aplicación de la CLAR y otras técnicas analíticas para el aislamiento e identificación de alérgenos por contacto en mezclas complejas como la colofonia. Se desarrollaron técnicas mediante la CLAR para aislar los posibles componentes de colofonia, los cuales fueron ensayados en individuos sensibles. La estructura de la mayoría de los componentes dermatológicamente activos fue determinada usando espectrometría de masas, RMN y técnicas infrarrojas. También se realizó un método de CLAR que permite la identificación de colofonia en productos comerciales, proporcionando una valiosa herramienta para determinar la causa de la alergia por contacto con colofonia. El estudio muestra que los ácidos de resina oxidados son sensibilizadores más fuertes que los mismos ácidos, siendo el ácido 7-oxidehidroabiético, el alérgeno por contacto más potente. Se encontró también, que todos los ácidos de resina no oxidados juegan un papel insignificante en la dermatitis por colofonia, excepto el ácido abiético (99% de pureza), que presentó una débil, pero importante actividad alérgica. Se analizaron además, muestras de ácido abiético comercial Trolab (de pureza desconocida), encontrándose que éste presenta más actividad dermatológica que el ácido abiético puro^{27,28}.

- *Actividad alérgica de ésteres de glicerol y otros ésteres de colofonia.* Para investigar si la esterificación de colofonia con polialcoholes cambia su potencial alergénico, el ácido abiético fue esterificado con glicerol a alta temperatura. El principal producto formado fue aislado e identificado como gliceril triabietato (GTA), usando RMN, IR y espectrometría de masas. Los resultados de experimentos con animales, muestran que el GTA no presentó actividad alérgica

Al poner a prueba a los pacientes sensibles a la colofonia, ninguno reaccionó al GTA. Algunos de los pacientes reaccionaron a colofonias esterificadas con glicerol y con pentaeritritol. De acuerdo con los análisis hechos mediante HPLC, éstas colofonias esterificadas aún contenían material no modificado, lo cual podría ser la causa de la reacción alérgica de los pacientes. Al parecer, la esterificación de la rosina con polialcoholes como el glicerol, reduce su actividad alérgica²⁹.

3. METODOLOGÍA

3.1 REACTIVOS E INSTRUMENTOS

Los reactivos e instrumentos utilizados durante el desarrollo del proyecto se encuentran en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Reactivos utilizados durante el proceso

REACTIVO	MARCA
Acetonitrilo grado HPLC	Fischer Scientific
Ácido abiético estándar	Sigma
Ácido fosfórico grado analítico	Mallinckrodt
Ácido sulfúrico GR	Merck
Agua grado HPLC	Merck
Alcohol etílico GR	Merck
Alcohol isopropílico GR	Merck
Éter etílico grado analítico	Merck
Ftalato ácido de potasio grado analítico	Carlo Erba
Hidróxido de sodio grado analítico	Mallinckrodt
Metanol GR	Merck

Tabla 9. Equipos utilizados en el proceso

EQUIPO	MARCA
Balanza analítica	Mettler AJ 150
Analizador de humedad	Mettler PM 480
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución	Waters 1515 con detector UV. Bomba isocrática
Columna	Bondapack C ₁₈ 3.9 x 150 mm
Detector UV	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Estufa	BD-115UL Binder Gm bH
Ultrasonido	Branson 1510
Espectrofotómetro	UV-Vis Spectronic Genesys 5
Infrarrojo	IR 200 spectrometer Thermo Electronic Corporation.

3.2 TOMA DE MUESTRAS

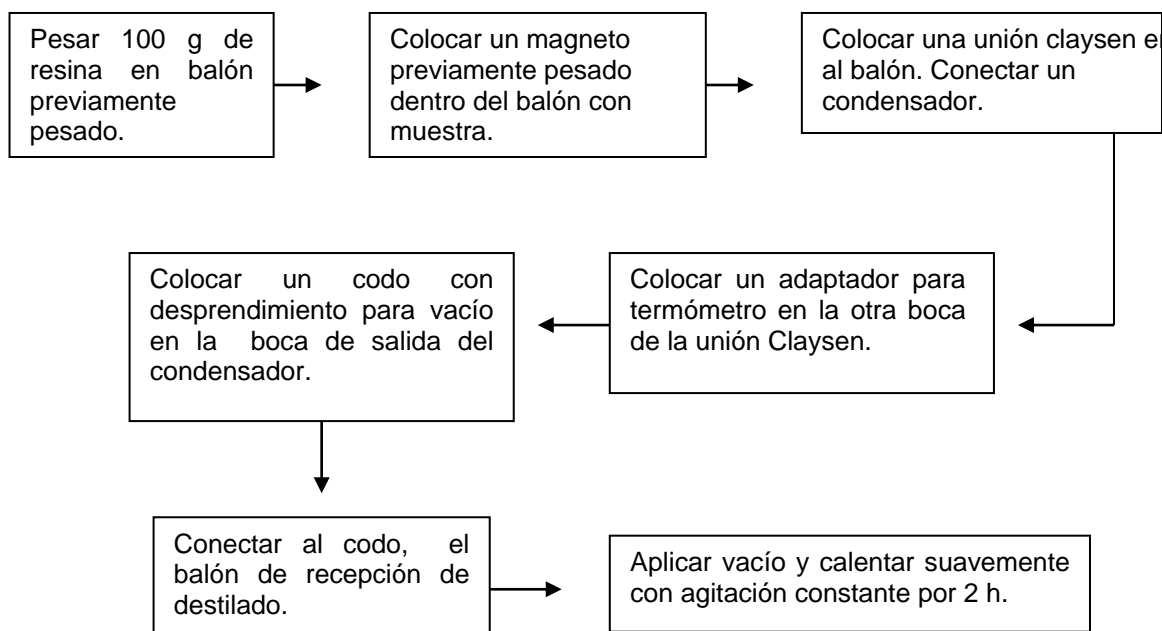
Las muestras de resina de *Pinus patula* provienen de árboles de 16 años de edad, de plantaciones pertenecientes a la empresa Smurfit Cartón de Colombia, ubicada en la Reserva Forestal de Sotará (Paispamba); al suroccidente de la ciudad de Popayán, la cual presenta un clima frío (12°C); una altitud: 1800 msnm, longitud: 76° 33' 40" (occidente) y latitud: 2° 18' 40" (Norte). Dichas muestras fueron extraídas de los árboles mediante el Sistema de Resinación Americano "Cup & Gutter (Copa y Canal), el cual fue realizado en otro proyecto de investigación³⁰. Las muestras analizadas en el laboratorio, fueron tomadas del lugar de almacenamiento de resina y guardadas en frascos, protegiéndolas de la luz y el calor.

Por otro lado, tres muestras (hojas y ramas) del árbol de *Pinus patula*, se encuentran registradas en el Herbario de la Universidad del Cauca.

3.3 DESTILACIÓN DE LA RESINA

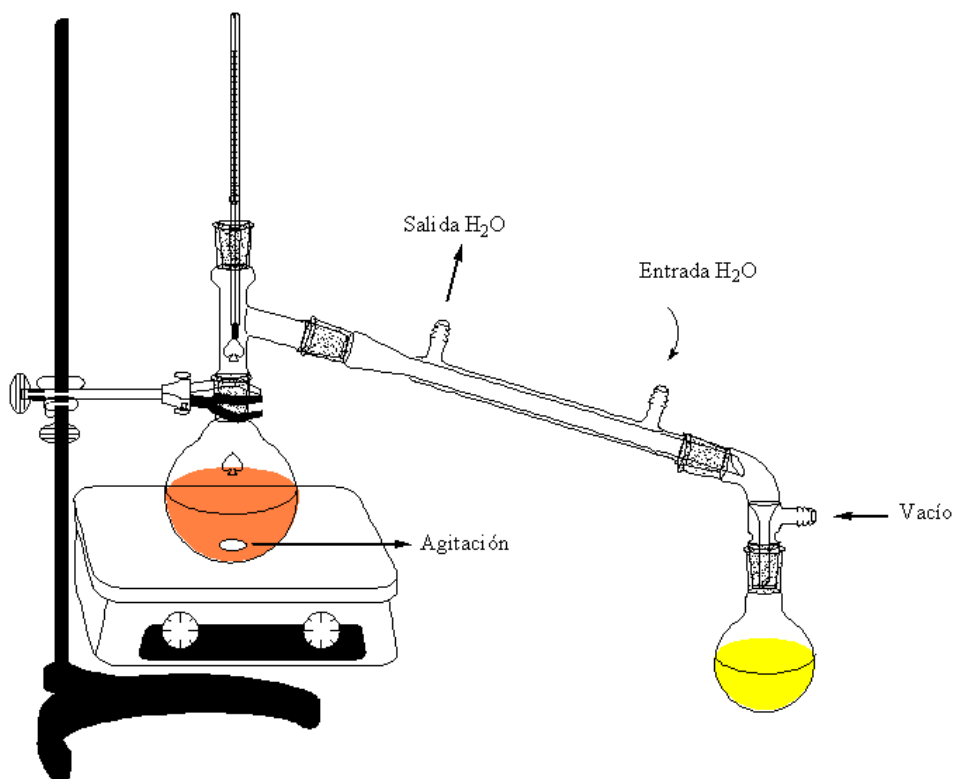
La destilación de la resina se llevó cabo mediante el procedimiento que se muestra en la figura 5.

Figura . Diagrama de flujo para la destilación de resina



La destilación de la resina se realizó por triplicado, cuyo montaje es mostrado en la figura 6.

Figura 6. Montaje de destilación simple de resina



3.4 PORCENTAJE DE HUMEDAD

3.4.1 Resina. Se coloca el destilado obtenido en un embudo de separación y se procede a separar la fase acuosa de la fase orgánica (trementina). Luego se mide el volumen obtenido de fase acuosa y finalmente se calcula el porcentaje de humedad mediante la ecuación 1 (véase el Anexo A).

3.4.2 Colofonia. Se determinó mediante el empleo de un analizador de humedad, pesando 1,0 gramo de muestra a 105-°C por 30 minutos. El procedimiento determina los sólidos de la muestra. La diferencia entre el peso de la muestra y el peso de dichos sólidos es igual a la humedad. El analizador de humedad permite obtener datos más rápidos y precisos que en la estufa, además, se requiere una mínima cantidad de muestra y es muy confiable.

3.5 PORCENTAJE DE IMPUREZAS

La colofonia obtenida después del proceso de destilación presenta algunas impurezas como corteza, hojas, insectos, etc. Para separar las impurezas de la colofonia, se filtra en caliente la colofonia en un embudo buchner, empleando un papel filtro de poro grande. Casi siempre, van a quedar pegadas partículas de impurezas en el embudo buchner; por lo tanto, debe ser previamente pesado al igual que el papel filtro. La colofonia se coloca finalmente en moldes de cartón. Teniendo en cuenta los pesos tomados antes y después del proceso se puede obtener el porcentaje de impurezas.

3.6 PARÁMETROS DE CALIDAD PARA RESINA Y COLOFONIA.

Todas las pruebas de calidad se realizaron por triplicado. El contenido de materia insaponificable y los índices de saponificación y acidez, se determinaron tanto para resina como para colofonia, de acuerdo con las Normas Internacionales ASTM³¹. La cantidad de muestra utilizada fue menor que la recomendada por las normas, disminuyendo a su vez, la cantidad de reactivos.

3.6.1 Índice de saponificación para resina y colofonia. Se pesaron 2.0 g de muestra en un balón y se disolvieron en 25 mL de un alcohol neutro, etanol para colofonia y metanol para resina. Se adicionaron 25 mL de solución alcohólica de KOH 0.5 N. Luego se reflujo la muestra disuelta, permaneciendo en ebullición por una hora. Se enfrió la solución y posteriormente se tituló con ácido sulfúrico estandarizado 0.5 N, usando 3 gotas de solución de fenolftaleína. Se repitió el procedimiento para el blanco. Finalmente, se calculó el índice de saponificación mediante la ecuación 2 (véase el Anexo A).

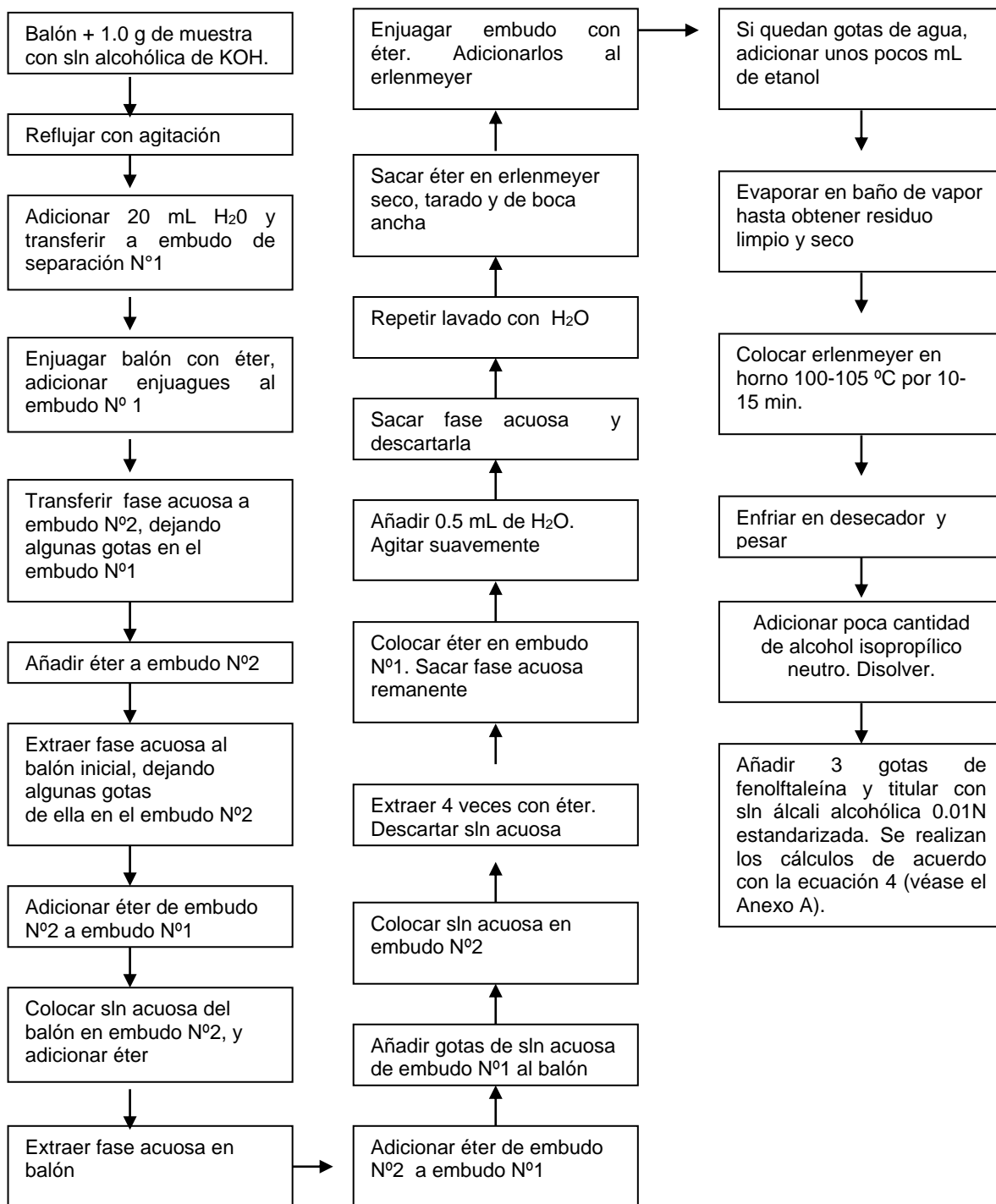
3.6.2 Índice de acidez para resina y colofonia. Se transfirió 1.0 g de muestra a un erlenmeyer y se adicionaron 25 mL de metanol para resina y etanol para colofonia. Luego se tituló con solución alcohólica de KOH estandarizada 0.5 N, usando 3 gotas de solución de fenolftaleína. Luego se determinó el índice de acidez de acuerdo con la ecuación 3 (véase el Anexo A).

3.6.3 Punto de reblandecimiento de la colofonia. Se pesan 2 gramos de colofonia en un vaso de 10 mL. Se calienta y se toma la temperatura en la cual se ablanda o reblandece, siendo éste el punto de reblandecimiento.

3.6.4 Materia insaponificable (MI) para resina y colofonia.

El contenido de materia insaponificable se realizó mediante el procedimiento mostrado en la figura 7. Los cálculos se realizaron de acuerdo con la ecuación 4 (véase el Anexo A).

Figura 7. Diagrama para la determinación del contenido de MI en resina y colofonia



3.7 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

3.7.1 Infrarrojo. Como parámetro de comparación, se tomaron espectros infrarrojo a dos tipos de colofonia: la obtenida en el laboratorio (*P.patula*) y una colofonia comercial.

3.7.2 Ultravioleta. Se preparó una solución de ácido abiético 500 ppm en etanol y luego, se realizó una corrida de 190-400 nm en el ultravioleta.

3.8 CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ABIÉTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cuantificación del ácido abiético se realizó mediante el método de curva de calibración, ya que es una técnica eficaz y muy comúnmente utilizada para analizar diferentes tipos de compuestos. Además, existen reportes sobre la determinación de ácido abiético mediante CLAR, obteniéndose buenos resultados (véase sección 2.4).

3.8.1 Pruebas de solubilidad. Para escoger el solvente más adecuado para la preparación de las soluciones, se realizaron pruebas de solubilidad con el estándar de ácido abiético y con colofonia de *Pinus patula*.

3.8.2 Preparación de las soluciones estándar. Se preparó una solución de ácido abiético de 1000 ppm en etanol grado HPLC, a partir de la cual se prepararon las soluciones estándar de trabajo, con el fin de llevar cabo el análisis cromatográfico. Todas las soluciones se filtraron utilizando un filtro de membrana Milli-pore de 0.45 μm .

3.8.3 Selección de la columna. Se ensayaron dos columnas, Bondapack C₁₈ 3.9 x 150 mm y SGE Octyl 5 μm 250 x 4 mm, escogiendo la más apropiada para el análisis.

3.8.4 Selección de la temperatura de la columna. Con el fin de optimizar el análisis se ensayaron diferentes temperaturas: 24, 40 y 60-°C.

3.8.5 Selección de la fase móvil. La selección de la fase móvil se hizo teniendo en cuenta el análisis realizado por la OSHA, donde se empleó la relación ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1). Sin embargo, se ensayaron otras proporciones de los solventes: ACN-H₂O-H₃PO₄ (70:30:0.1) y (80:20:0.1), con el fin de evaluar los resultados.

3.8.6 Selección de la longitud de onda de trabajo. Teniendo en cuenta las distintas longitudes de onda en las cuales los ácidos resínicos presentan absorción, se realizaron inyecciones a 220, 241, 250, 276 y 298 nm

3.8.7 Determinación del flujo óptimo. Éste se determinó mediante la construcción de la curva de Van Deemter, Flujo Vs Altura Equivalente de Plato Teórico (AEPT).

3.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.9.1 Linealidad. Se realizaron tres curvas de calibración con rangos de concentración entre 1-10 ppm, 10-100 ppm y 100-1000 ppm, para evaluar la linealidad del método. Las inyecciones se realizaron por triplicado.

3.9.2 Sensibilidad

- **Límite de detección (LOD).** El límite de detección se calculó utilizando la curva de calibración que contiene los rangos de concentración más bajos (1-10 ppm), haciendo cada inyección por triplicado. De esta forma, se efectuaron los cálculos para obtener la mínima concentración detectada de ácido abiético, utilizando la ecuación 6 (véase el Anexo B).

- **Límite de cuantificación (LOQ).** Para hallar el límite de cuantificación, se utilizó la misma curva de calibración que para el LOD. Los cálculos se realizaron empleando la ecuación 7 (véase el Anexo B).

3.9.3 Precisión

- **Repetitividad:** Para su determinación, se utilizaron las soluciones de ácido abiético de las curvas de trabajo, las cuales fueron inyectadas por triplicado en el cromatógrafo. Se calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas mediante las ecuaciones 9 y 10 (véase el Anexo B), respectivamente.

- **Reproducibilidad.** En este caso, se inyectó una vez por día, por tres días consecutivos, soluciones patrón de ácido abiético de 6, 60 y 600 ppm. Los cálculos se realizaron mediante las ecuaciones 9 y 10 (véase el Anexo B).

3.9.4 Exactitud del método. Se determinó evaluando la recuperación de ácido abiético con algunas de las concentraciones de las curvas de trabajo, las cuales se inyectaron por triplicado. Los valores de t_{obt} se calcularon empleando la ecuación 11 (véase el Anexo B).

3.10 Metodología de inyección de la muestra. Se realizó teniendo en cuenta el procedimiento llevado a cabo por Vieillescazes (sección 2.4). Se toman 33 mg de colofonia y se disuelven en 25 mL de etanol (1000 ppm). Posteriormente, se coloca en el ultrasonido por 10 minutos. Luego, se hace pasar por un filtro de membrana Milli-pore de 0.45 μm y finalmente se inyecta en el cromatógrafo.

Existen otras metodologías de extracción para la determinación de ácidos resínicos, las cuales se aplican principalmente en análisis de productos comerciales que afectan a personas sensibles a estas sustancias (véanse secciones 4.4 y 4.5). La concentración de los ácidos de colofonia en los productos comerciales como pañales, soportes de instalaciones eléctricas, entre otros, es pequeña (comparada con la colofonia obtenida por destilación de la resina), por lo cual, pueden presentarse interferencias que dependen de la composición del producto original.

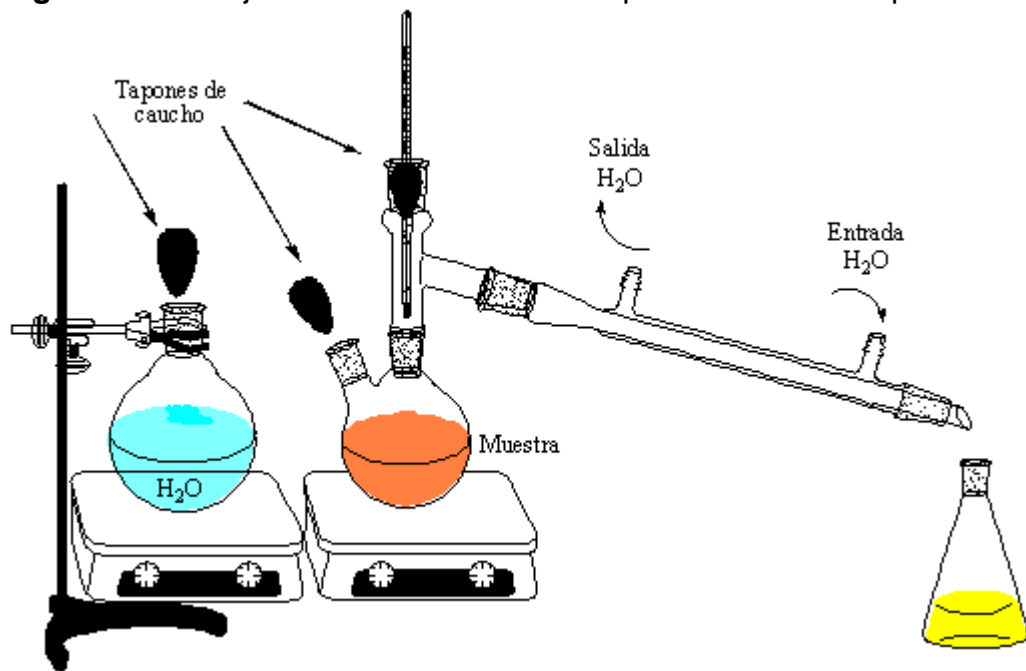
Debido a que las colofonias obtenidas mediante destilación de la resina de pino, contienen casi el 90% de ácidos resínicos, las interferencias debidas a otros compuestos son despreciables, lo cual fue comprobado durante el análisis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DESTILACIÓN DE LA RESINA

El primer ensayo que se hizo para obtener los subproductos de la resina (trementina y colofonia), fue mediante una destilación por arrastre con vapor, realizando un montaje como el que se muestra en la figura 8, empleando tapones de caucho que permitieran la conexión de un tubo desde el balón con agua hasta el balón que contiene la muestra. Al calentar la muestra, se genera vapor de trementina, destruyendo poco a poco el tapón de caucho y contaminando la muestra. Además, se requería aumentar demasiado la temperatura para obtener algo de destilado, sin lograrse una buena separación de los componentes de la resina.

Figura 8. Montaje de destilación de resina por arrastre con vapor



Debido a la dificultad de trabajar con resina, se procedió a realizar un montaje de destilación simple (véase figura 6) con aplicación de vacío, de tal forma que se disminuyera la temperatura de ebullición tanto del agua, como de la trementina, obteniéndose una mejor separación de los componentes de la resina y un menor tiempo en el proceso. En la tabla 10 se muestran los métodos de destilación de

resina utilizados, los parámetros como temperatura inicial de destilación (T°_i), tiempo de destilación, los porcentajes de trementina y colofonia obtenidos en cada caso y sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 10. Parámetros obtenidos de la destilación por arrastre con vapor y la destilación simple

Método	T°_i Destilación ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo destilación (horas)	%Trementina	Desviación estándar (trementina)	%Colofonia	Desviación estándar (colofonia)
Destilación por arrastre con vapor	80	4-5	3.5-4.5	0.503	No se separó totalmente	-
Destilación simple	52-58	2-3	13.5-14.6	0.551	70.3-74.6	2.150

Después de la destilación de la resina mediante el método de destilación simple, se calcularon los porcentajes de humedad para resina y colofonia y el porcentaje de impurezas para resina, los cuales se encuentran reportados en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de humedad de resina y colofonia. Porcentaje de impurezas de resina de *Pinus patula*

Muestra	%Humedad	%Impurezas
Resina	2.2-3.9	0.37-2.1
Colofonia	1.0-2.0	

El rendimiento obtenido tanto de colofonia, como de trementina es aceptable; ya que la literatura reporta valores para colofonia entre 70-75% y de 15% para trementina. Por lo tanto, puede decirse, que el método de destilación empleado fue eficiente.

Dentro de las propiedades físicas de la resina de *P. patula* están, su consistencia pastosa, semisólida y su coloración lechosa. Muestra un apreciable contenido de impurezas sólidas, constituidas principalmente por follaje, insectos, trozos de corteza y tierra.

Los porcentajes de humedad y de impurezas de la resina varían de acuerdo con las condiciones climáticas, lo cual puede alterar el proceso de recolección, sin variar significativamente la calidad de la muestra.

4.2 DETERMINACIÓN DE LAS NORMAS DE CALIDAD

Los índices de acidez y saponificación, y la cantidad de materia insaponificable, se realizaron en muestras frescas y almacenadas, observándose una variación de los parámetros de calidad con respecto al tiempo. Las diferencias de los datos mostrados en las tablas 12 y 13 muestran la importancia de analizar las muestras frescas, pues los valores cambiaron en todos los casos, ya que la inestabilidad de los ácidos resínicos, facilita su oxidación con el oxígeno atmosférico³². Las colofonias no modificadas son fácilmente oxidadas a causa de su principal constituyente, ácido abiético, debido a la presencia de sus insaturaciones. Por su tendencia a la degradación, la mayoría de las colofonias naturales deben ser modificadas para proporcionar los requerimientos de estabilidad, ya que la oxidación del ácido abiético produce colofonias más quebradizas y oscuras^{33,34}.

Los datos obtenidos de las muestras frescas de colofonia de *Pinus patula*; muestran valores aceptables, comparados con los datos teóricos reportados en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 12. Determinaciones de calidad en muestras frescas

Muestra	Índice de Acidez	Índice saponificación	Materia Insaponificable
Resina	137.6-138	136.20-138	23.6
Colofonia	155-158	153-160	4.8-7.6

Tabla 13. Determinaciones de calidad en muestras almacenadas

Muestra	Índice de Acidez	Índice saponificación	Materia Insaponificable
Resina	110.83	101.5	17.37-17.71
Colofonia	132.9-133.8	134.4-136.3	8.1-11.2

El color es tenido en cuenta para la comercialización de la colofonia, siendo de mejor calidad si ésta es más clara. La coloración de la colofonia obtenida es algo oscura, más exactamente amarillo rojizo, correspondiendo según la tabla de clasificación de color a un grado K. Esto puede ser atribuido a la especie de pino, a posibles deficiencias en el método de extracción de resina del árbol vivo o a un almacenamiento inadecuado de la resina, tanto en el sitio de extracción, como en el laboratorio.

Para evitar el sobrecalentamiento de la resina, y por ende la obtención de colofonia oscura, podría mejorarse el método de destilación, para obtener productos más claros, disminuyendo aún más la temperatura de destilación. Así mismo, pueden adicionarse algunas sustancias empleadas a nivel industrial, como ácido oxálico o furfural para el mismo fin. La obtención de colofonias modificadas es una buena alternativa para conseguir colofonias más claras y también productos con mejores características de calidad de acuerdo con las necesidades³⁵.

El punto de reblandecimiento de la colofonia obtenida está entre 74-76°C, el cual se encuentra dentro del rango teórico mostrado en la tabla 3. Esto indica una calidad aceptable, pues existen otras colofonias con puntos de reblandecimiento mayores, indicando una mejor calidad. Sin embargo, el punto de reblandecimiento puede mejorarse, obteniendo colofonias modificadas mediante reacciones de isomerización y de oxidación; en éste último caso, se obtiene un producto llamado *colofonia endurecida*, lográndose un aumento de más de 20-°C. Se ha sugerido el uso de estas colofonias endurecidas mezcladas con nitrocelulosa en lacas, en un sustitutivo de la goma laca con ésteres de celulosa y alcanfor y en fórmulas para punteras de zapatos, con cera montana, gilsonita y otros materiales³⁶.

4.3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

4.3.1 Espectroscopía Infrarroja en Colofonia. Se tomaron espectros infrarrojo (IR) a la colofonia de *P. patula* y a una colofonia comercial para comparar los resultados, tal como se muestra en las figuras 9 y 10, donde se pueden observar las bandas características de los ácidos resínicos.

En la tabla 14 se muestran las principales bandas presentes en los espectros IR de colofonia de *P. patula* y colofonia comercial, con sus correspondientes grupos funcionales³⁷.

Tabla 14. Principales bandas del espectro IR en colofonia de *P. patula* y colofonia comercial

Banda (cm ⁻¹)		Grupo Funcional
Colofonia <i>P. Patula</i>	Colofonia comercial	
2931.60	2933.52	Tensión C-H
1694.35	1691.45	Tensión C=O
Banda ancha alrededor de 3000 cm ⁻¹		Tensión O-H
1462.91	1460.97	Flexión CH ₂
1384.40	1385.75	Oscilación CH ₃
1183.24	1182.29	Tensión C-C
652.86	709.75	Oscilación CH ₂

Figura 9. Espectro infrarrojo de colofonia de *P. Patula*

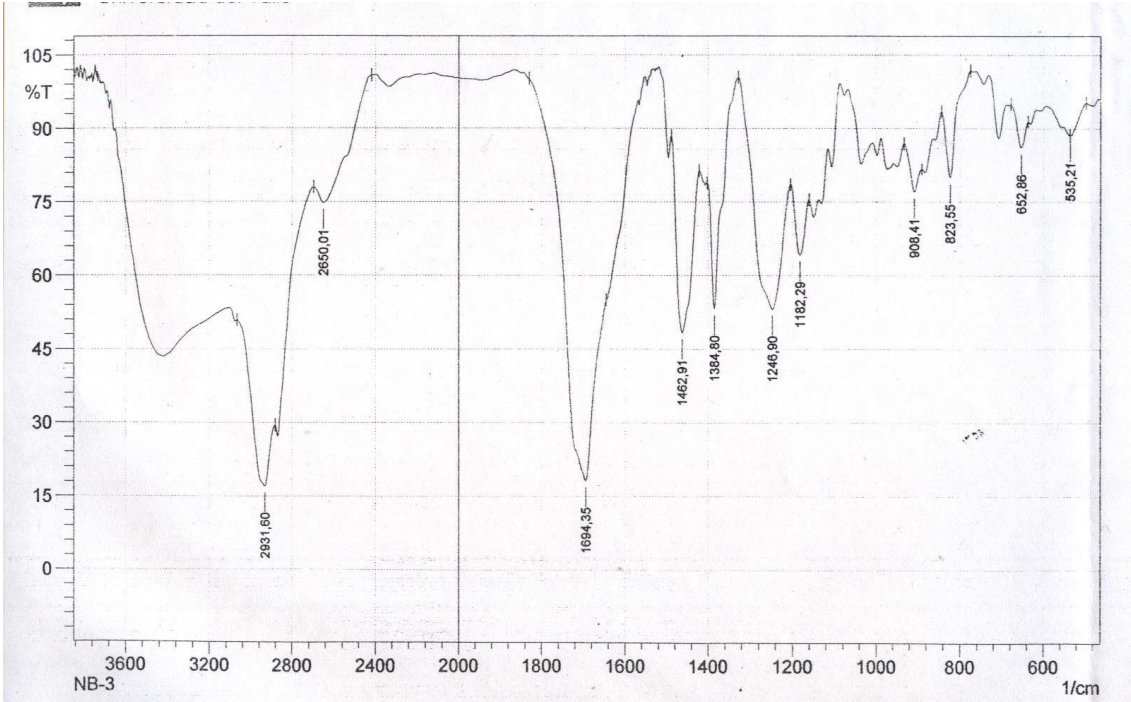
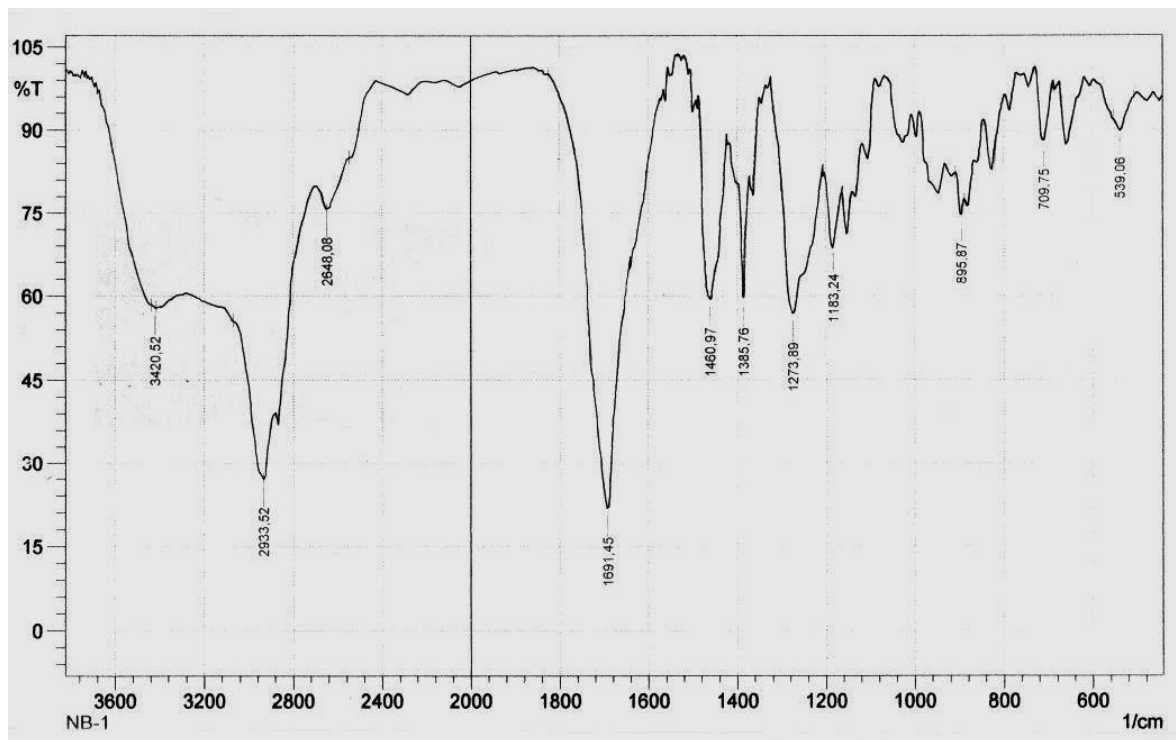
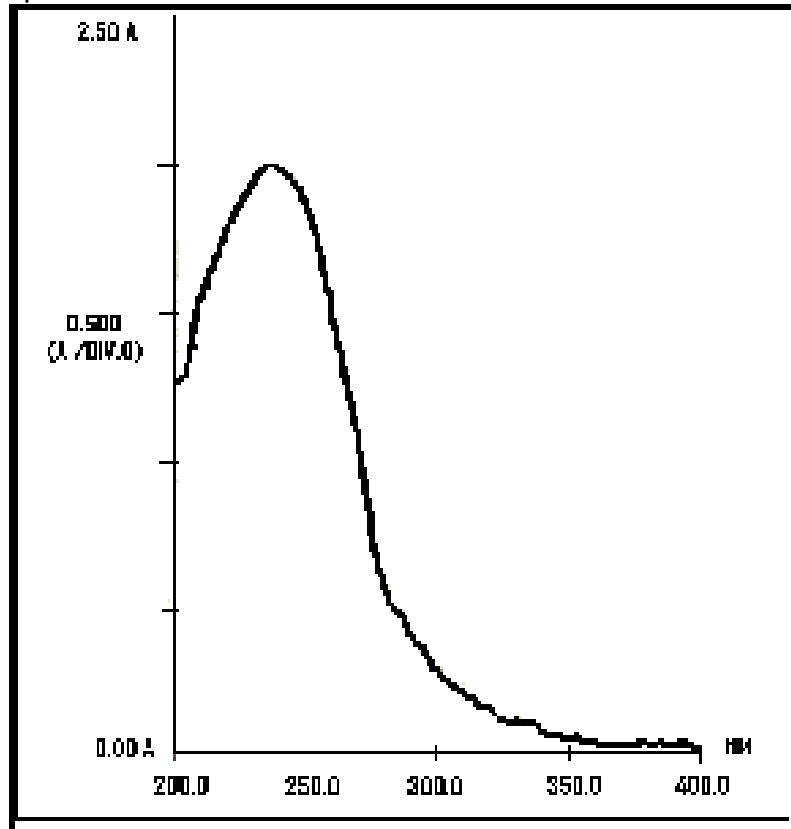


Figura 10. Espectro infrarrojo de colofonia comercial.



4.3.2 Espectroscopía ultravioleta para el Ácido Abiético. Se tomó un espectro ultravioleta de ácido abiético en el rango de 200 - 400 nm. Como se observa en la figura 11, la presencia de este compuesto se verifica por la banda de absorción característica alrededor de los 240-250 nm; debido a la presencia de dobles enlaces conjugados en la molécula.

Figura 11. Espectro UV de ácido abiético.



4.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

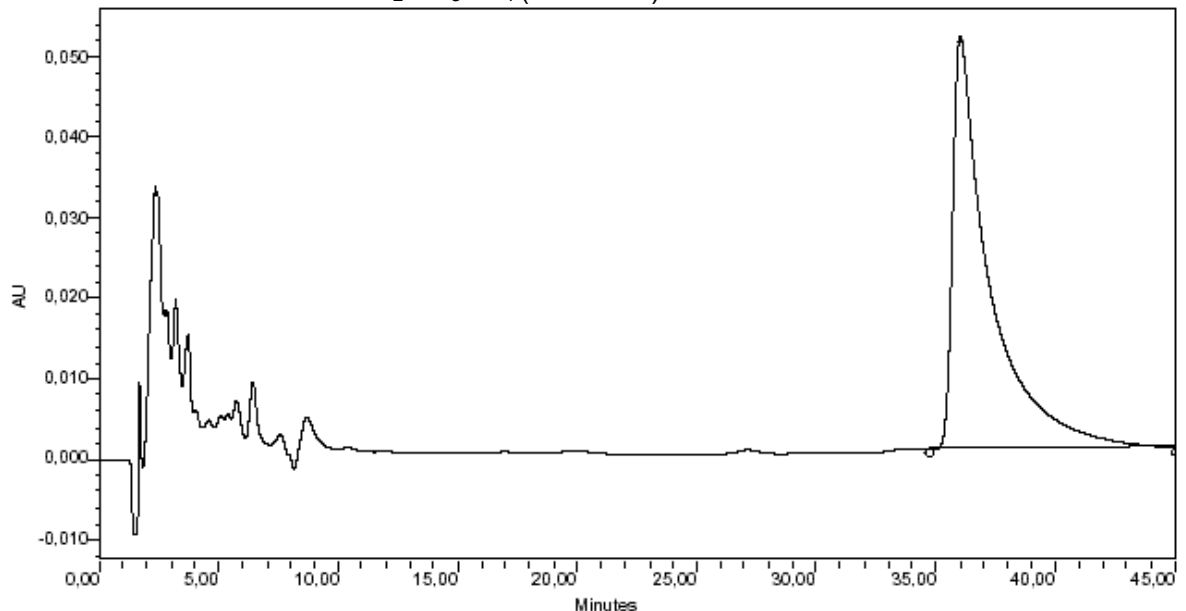
4.4.1 Evaluación de la solubilidad de colofonia. Se realizaron pruebas de solubilidad para colofonia de *P. Patula* y colofonia comercial. Los resultados que se muestran en la tabla 15, indican que la colofonia presenta mayor solubilidad en solventes orgánicos de mediana polaridad.

Tabla 15. Pruebas de solubilidad de colofonia de *Pinus patula* y colofonia comercial.

MUESTRA	SOLVENTES			
	Agua	Metanol	Acetonitrilo	Etanol
Colofonia <i>P. patula</i>	Insoluble	Soluble	Soluble	Muy soluble
Colofonia comercial	Insoluble	Soluble	Muy soluble	Muy soluble

4.4.2 Selección de la columna. Las columnas ensayadas fueron: Bondapack C₁₈, 3.9 x 150 mm y SGE Octyl 5um 250 x 4 mm. La figura 12, muestra el cromatograma obtenido con la columna SGE Octyl 5um 250 x 4 mm; donde se presenta un ensanchamiento de banda, que se observa como una larga cola. Esto es debido a que pequeñas cantidades de soluto se retienen más fuertemente que grandes cantidades. Ello conduce a un incremento relativamente abrupto de la concentración al comienzo de la banda, y una larga *cola* en la cual la concentración decrece gradualmente después del pico. Una de las causas de la aparición de colas es la presencia de sitios en los cuales la fase estacionaria retiene fuertemente al soluto. Cuando estos sitios se saturan con el soluto, el coeficiente de reparto disminuye porque no hay sitios de retención fuerte disponibles para detener nuevo soluto. En algunos casos, el ensanchamiento de banda puede ocurrir también durante la inyección y la detección. La formación de colas puede corregirse mediante el uso de muestras más pequeñas y por enmascaramiento de los sitios de adsorción fuerte en la fase estacionaria³⁸. En el cromatograma de la figura 12, también se observa un tiempo de retención largo; por lo tanto, se escogió la columna Bondapack, en donde no se presentaron inconvenientes por ensanchamiento de banda, observándose una buena señal para el ácido abiético, con un tiempo de retención mucho menor. Además, los reportes descritos en la sección 2.4, indica que dicha columna es apta para la determinación de ácidos resínicos.

Figura 12. Cromatograma del ácido abiético. Columna SGE Octyl 5um 250 x 4 mm. Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)



4.4.3 Optimización de la temperatura de la columna. Se probaron tres temperaturas diferentes: 24, 40 y 60°C. Los cromatogramas obtenidos a estas temperaturas se encuentran en las figuras 13, 14 y 15, donde se observa que a una temperatura de 60°C, se reduce el tiempo de análisis.

Figura 13. Cromatograma de ácido abiético. 24°C. Columna Bondapack C₁₈.
Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)

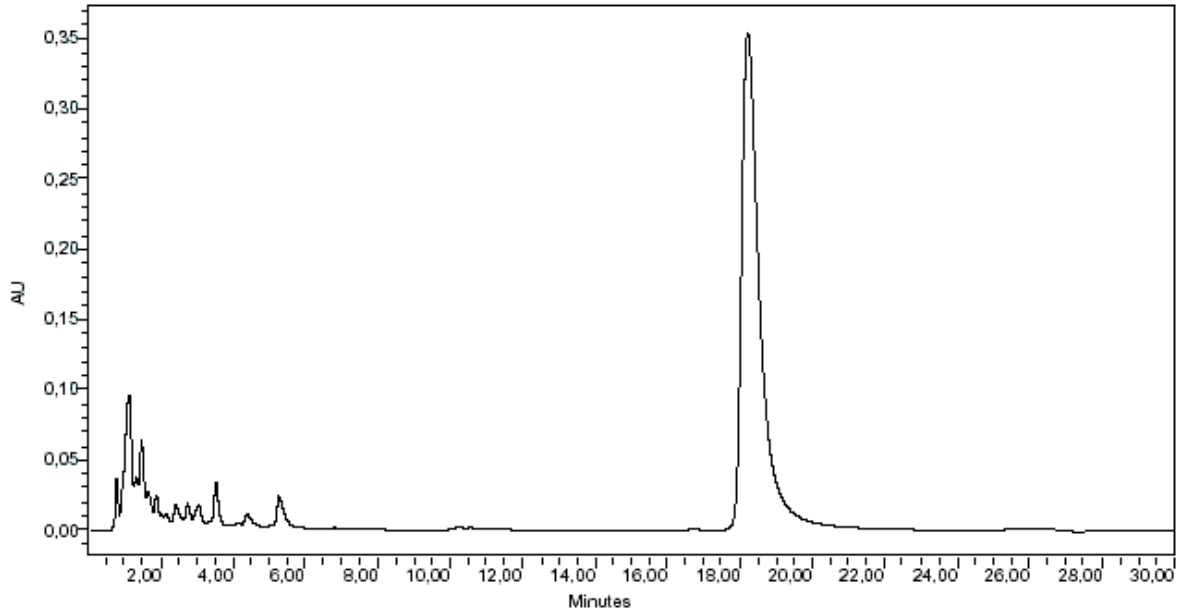


Figura 14. Cromatograma de ácido abiético. 40°C. Columna Bondapack C₁₈.
Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)

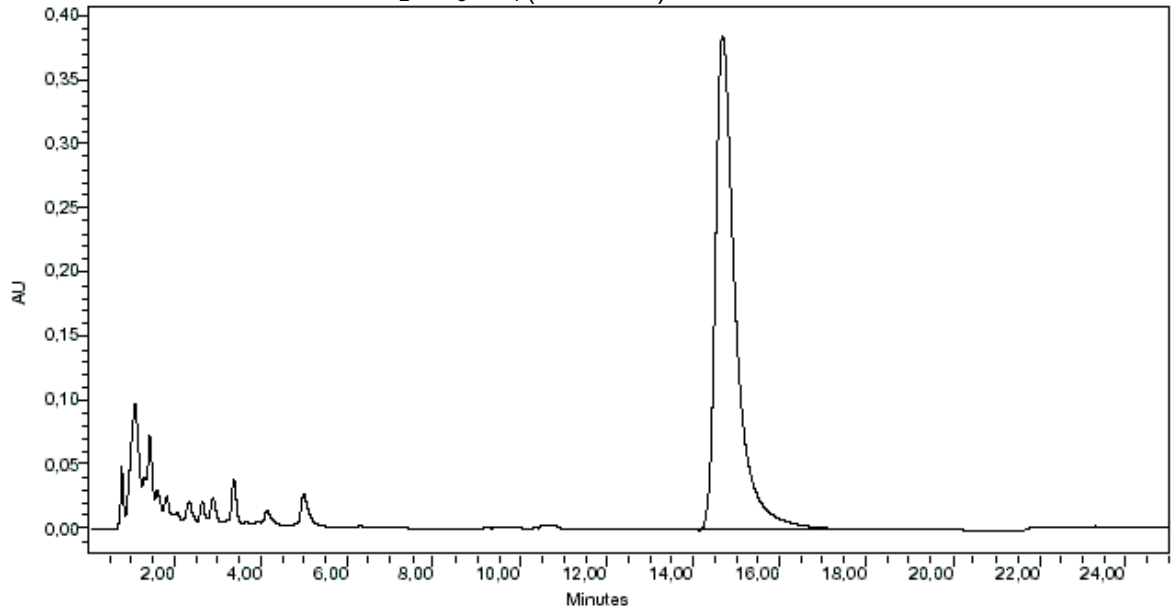
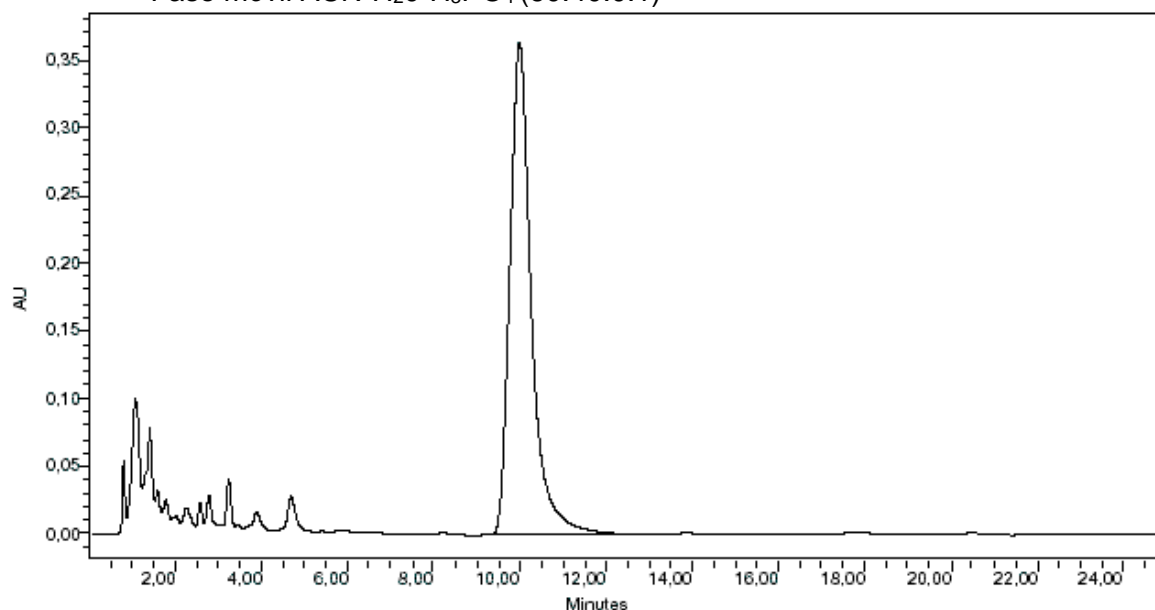
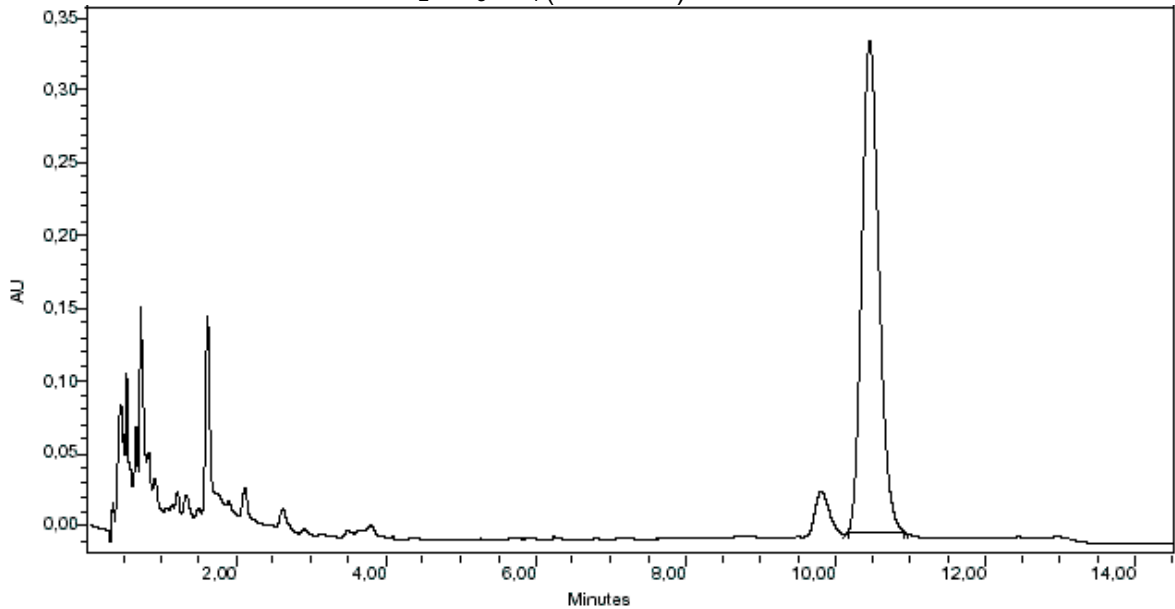


Figura 15. Cromatograma de ácido abiético. 60°C. Columna Bondapack C₁₈.
Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)



4.4.4 Optimización de la fase móvil. La selección de la fase móvil se hizo variando las proporciones de los solventes de la siguiente manera: ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1), (70:30:0.1) y (80:20:0.1), respectivamente. Inicialmente se inyectó el estándar de ácido abiético, obteniéndose tiempos más cortos a medida que se aumenta la proporción de ACN y se disminuye la de H₂O. Esto es debido a que la polaridad de la fase móvil disminuye, solubilizando al ácido abiético y haciendo más cortos los tiempos de retención. Sin embargo, al inyectar la muestra de colofonia comercial en estas mismas condiciones, se vio afectada la separación de dos compuestos, entre ellos, el ácido abiético. La figura 17 muestra el cromatograma de colofonia comercial obtenido con la fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1), donde se observa una buena separación de dos de los compuestos presentes en dicha muestra. Los cromatogramas de colofonia comercial obtenidos con las otras proporciones de fase móvil se encuentran en el Anexo C. La diferencia en el pH de las tres proporciones de fase móvil no es significativo, todas estaban alrededor de 2,3-2,4.

Figura 16. Cromatograma de colofonia comercial. Columna Bondapack C₁₈. 60-°C
Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)



4.4.5 Selección de la longitud de onda de trabajo. Para corroborar la información obtenida en el espectro ultravioleta, se realizaron inyecciones de ácido abiético de la misma concentración (500 ppm), a longitudes de onda diferentes (220, 241, 250, 276 y 298 nm), las cuales se muestran en las figuras 17, 18, 19, 20 y 21.

Figura 17. Cromatograma de ácido abiético. 220 nm. Columna Bondapack C₁₈. 60-°C
Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)

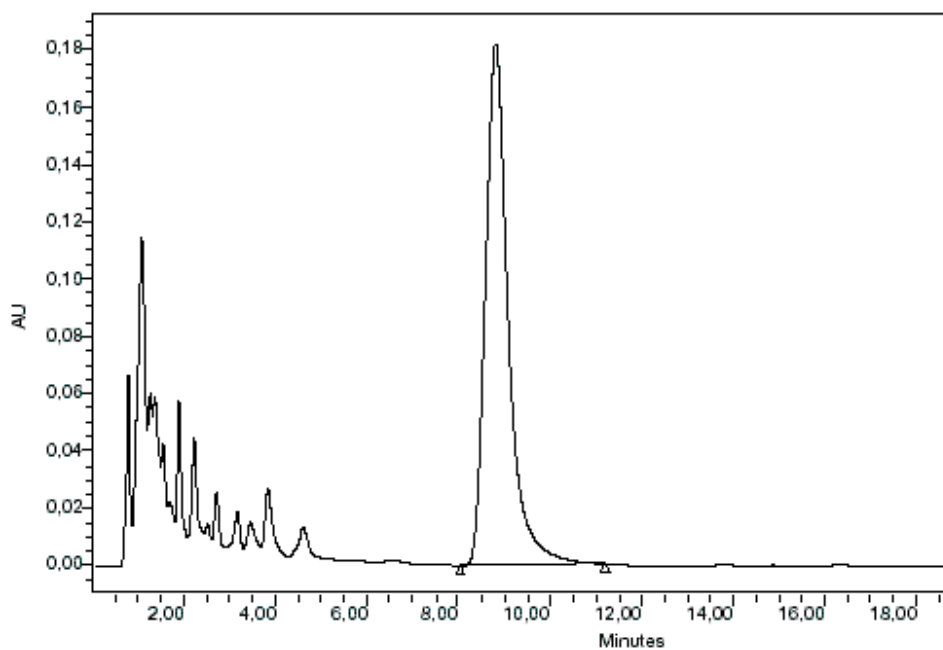


Figura 18. Cromatograma de ácido abiético. 241 nm. Columna Bondapack C₁₈. 60-°C
Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)

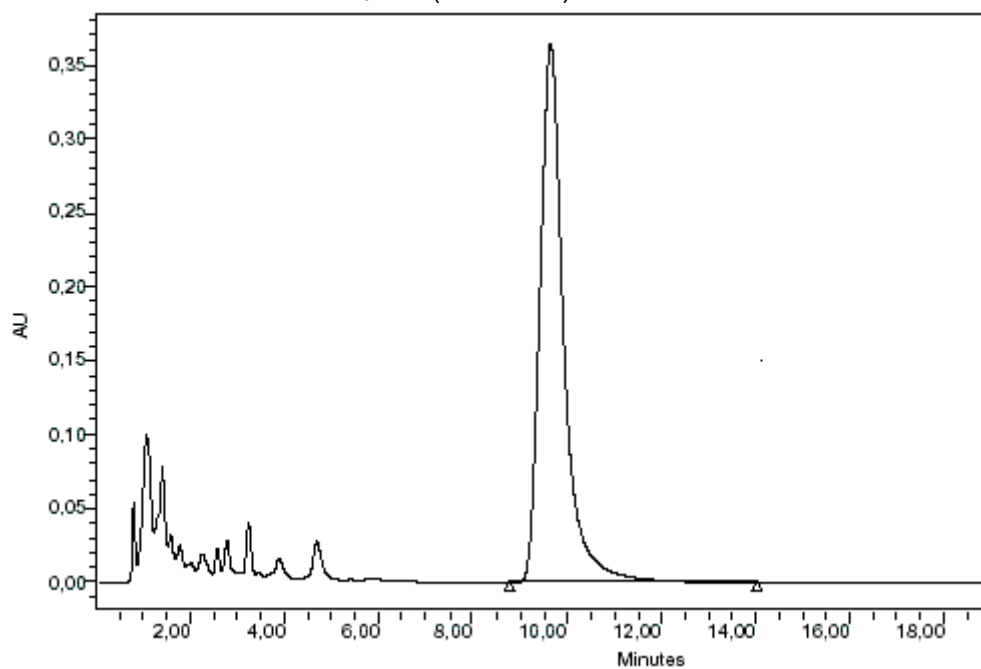


Figura 19. Cromatograma del ácido abiético a 250 nm. Columna Bondapack C₁₈.
60-°C. Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)

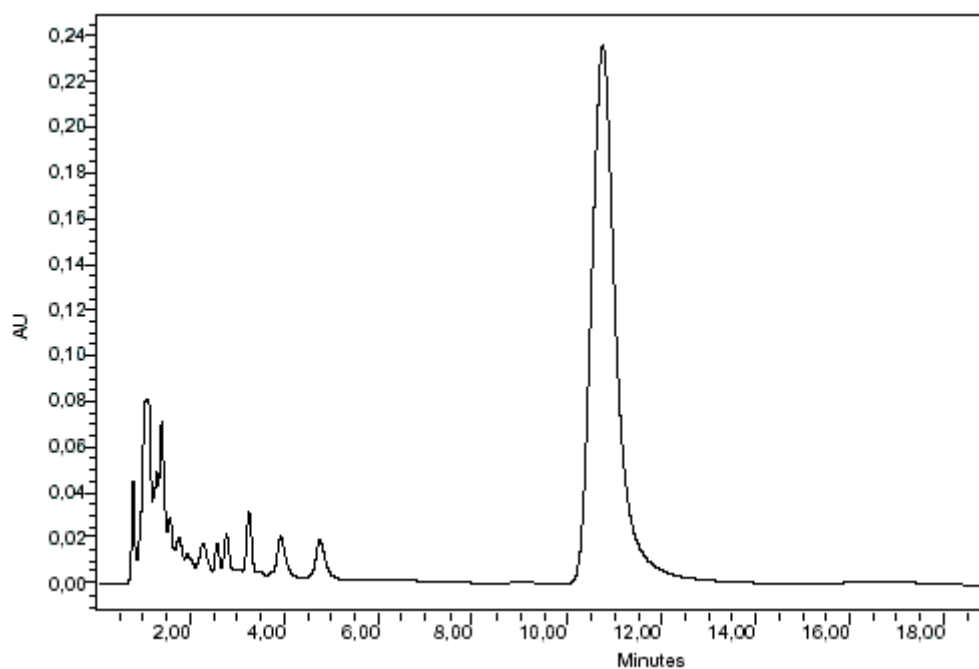


Figura 20. Cromatograma del ácido abiético a 276 nm. Columna Bondapack C₁₈. 60-°C. Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)

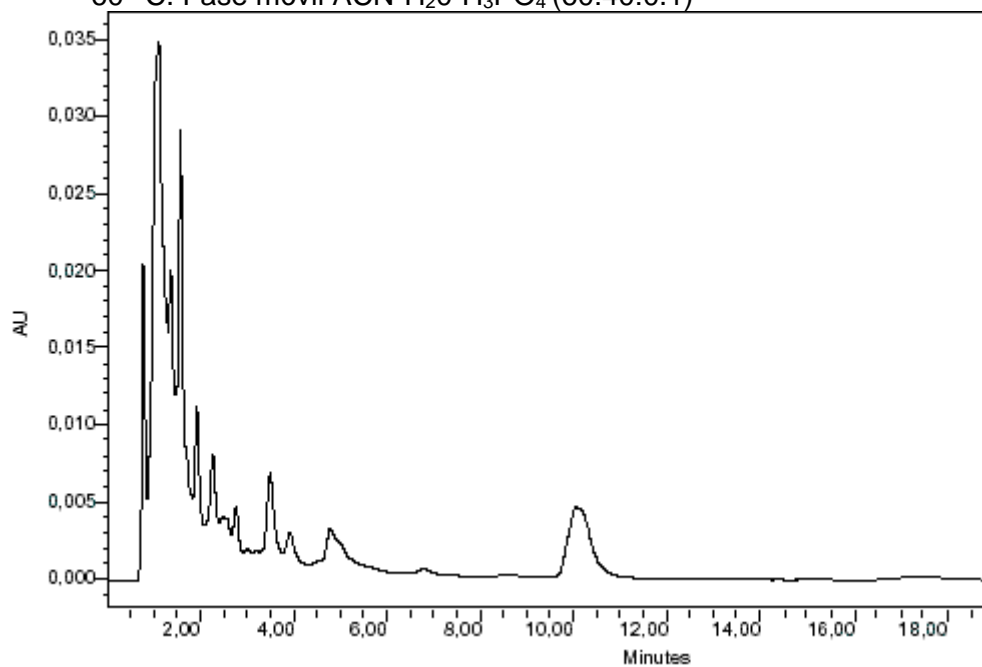
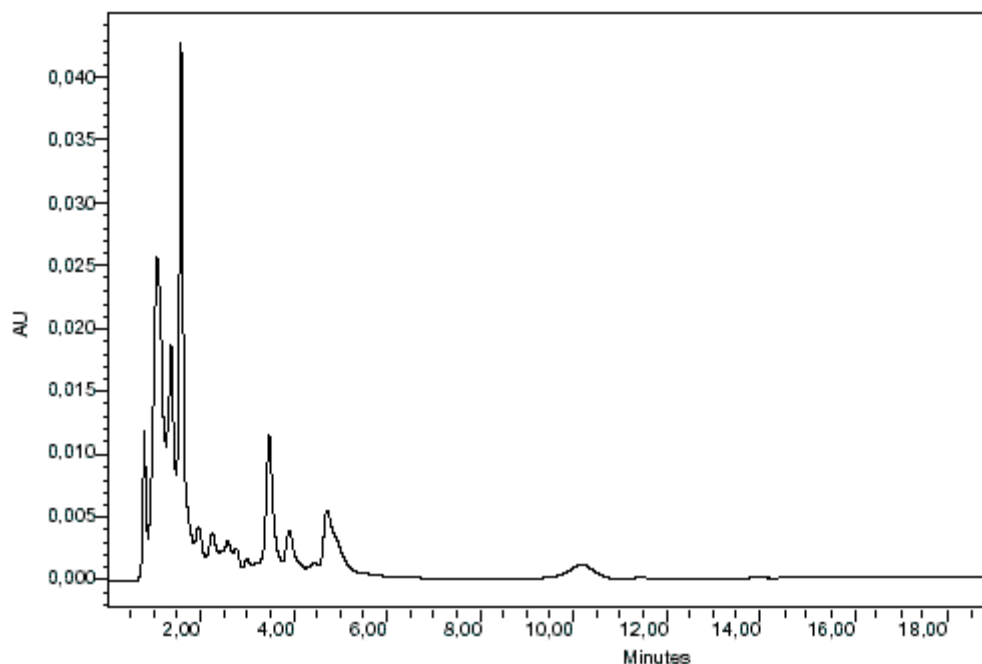


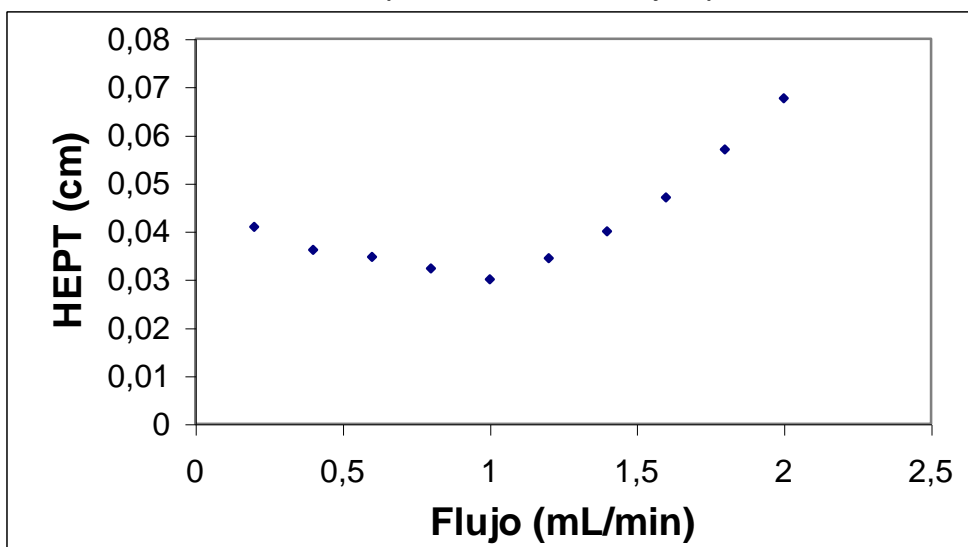
Figura 21. Cromatograma del ácido abiético a 298 nm. Columna Bondapack C₁₈. 60-°C. Fase móvil ACN-H₂O-H₃PO₄ (60:40:0.1)



En los cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda, se puede observar que la mayor área se obtuvo a 241 nm, por lo cual fue escogida como longitud de onda de trabajo.

4.4.6 Determinación del flujo óptimo. Mediante la curva de Van Deemter se determinó el flujo óptimo. En la figura 22, Flujo Vs Altura Equivalente de Plato Teórico (AEPT), se observa que el flujo óptimo es 1.0, ya que el valor correspondiente de AEPT es el más bajo.

Figura 22. Curva de Van Deemter para determinar flujo óptimo



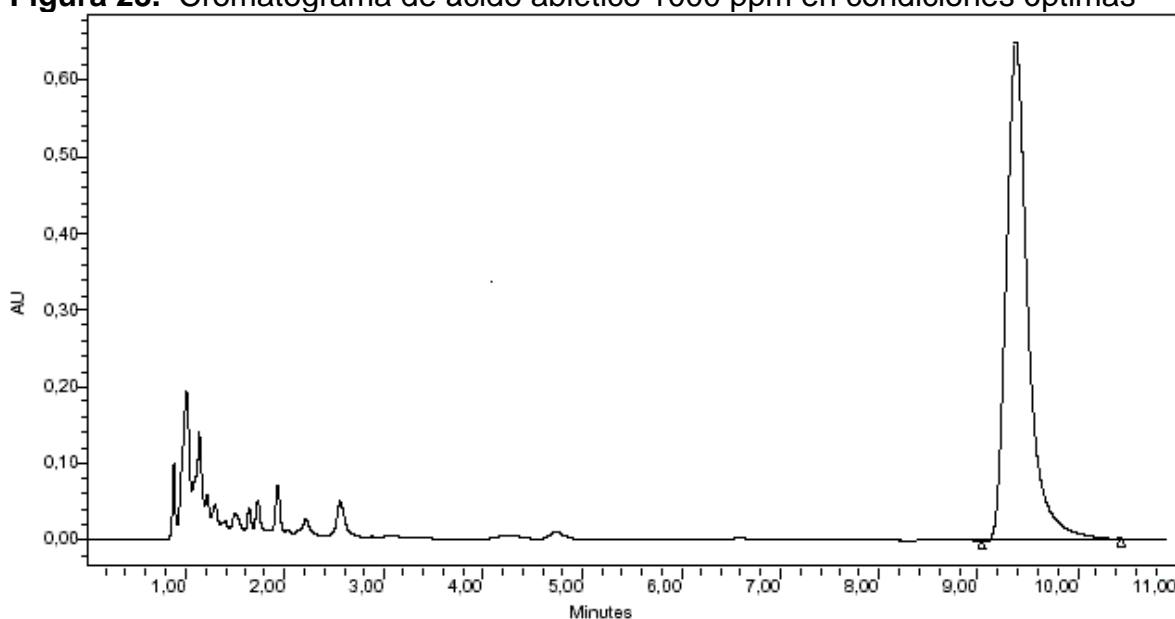
4.4.7 Condiciones cromatográficas óptimas. En la tabla 16 se reportan las condiciones óptimas para el análisis de ácido abiético en colofonia de la especie *Pinus patula*.

Tabla 16. Condiciones cromatográficas óptimas en HPLC

Columna	Bondapack C ₁₈ , 3.9 x 150 mm
Volumen de inyección	10µL
Flujo	1.0 mL/min
Elusión	Isocrática
Fase móvil	ACN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (60:40:0.1)
Detector	Ultravioleta 241nm
Temperatura columna	60-°C

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se inyectó el estándar de ácido abiético, obteniéndose un pico resuelto como se observa en la figura 24.

Figura 23. Cromatograma de ácido abiético 1000 ppm en condiciones óptimas



4.5 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.5.1 Linealidad. Las curvas de calibración realizadas con rangos de concentración entre 1-10 ppm, 10-100 ppm y 100-1000 ppm, se muestran en las figuras 24, 25 y 26.

Figura 24. Curva de calibración para ácido abiético en un rango de 1–10 ppm

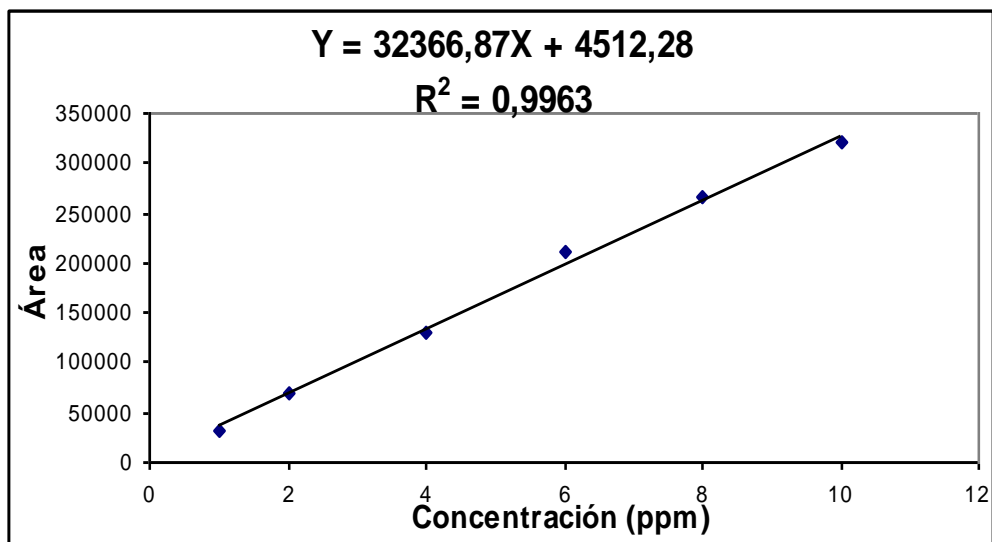


Figura 25. Curva de calibración para ácido abiético en un rango de 10 – 100 ppm

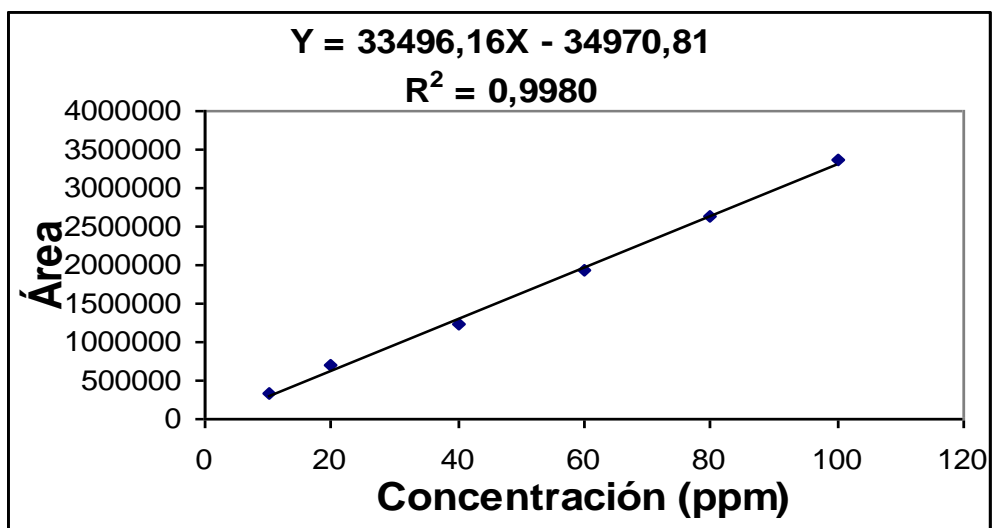
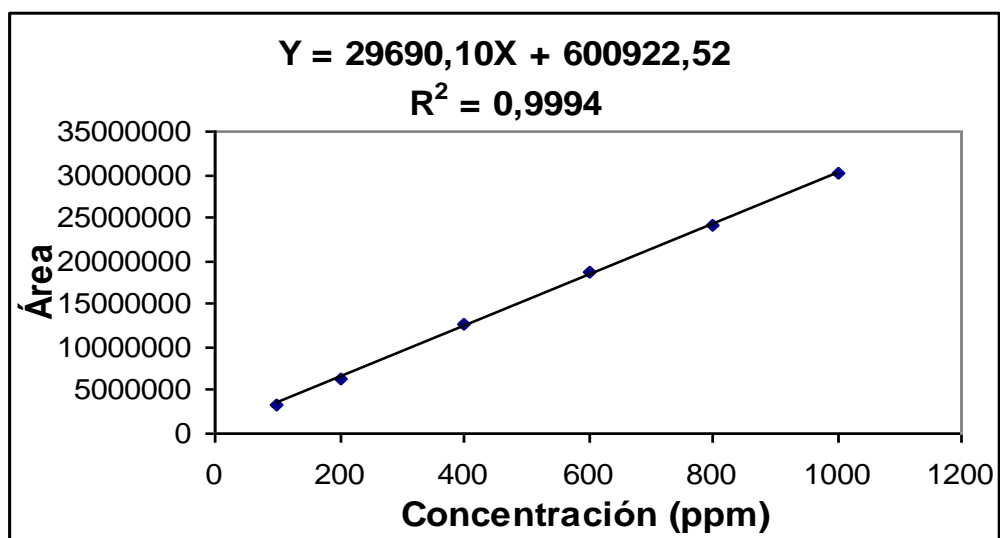


Figura 26. Curva de calibración para ácido abiético en un rango de 100–1000 ppm



Los coeficientes de correlación obtenidos (R^2) son cercanos a uno, lo cual indica la respuesta lineal que presenta el ácido abiético dentro de los rangos de concentración utilizados.

4.5.2 Sensibilidad

- **Límite de detección (LOD).** El límite de detección para el ácido abiético es de 0.091 ppm (véase tabla 17), lo cual indica que se puede detectar dicho compuesto en muestras que contengan bajas concentraciones. En la tabla 18 se muestran los datos de límite de confianza, para dos grados de libertad y un 95% de confianza.

Tabla 17. Límite de detección para ácido abiético

DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PENDIENTE (SB)	INTERCEPTO CON EJE Y (YB)	VALOR Y	LÍMITE DE DETECCIÓN (ppm)
984.404	4512.284	7465.497	0.091

Tabla 18. Datos para calcular intervalo de confianza.

CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RSD	LÍMITE CONFIANZA 95%, 2 GRADOS DE LIBERTAD
1	33241	61,733	0,186	±153.548

2	69187,333	770,644	1,114	±1916.810
4	130595,333	1713,005	1,312	±4260.728
6	211272	1103,072	0,522	±2743.653
8	265090	4898,475	1,848	±12183.895
10	321061	1076,985	0,335	±2678.767

- **Límite de cuantificación (LOQ).** Se empleó la misma curva de calibración que en LOD, para hallar el límite de cuantificación. La tabla 19 muestra los datos obtenidos, donde se puede observar que el valor mínimo cuantificable es de 0.304 ppm, demostrando la buena respuesta del método para este tipo de compuestos.

Tabla 19. Límite de cuantificación para ácido abiético

DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PENDIENTE (SB)	INTERCEPTO CON EJE Y (YB)	VALOR Y	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (ppm)
984.404	4512.284	14356.327	0.304

Los buenos valores obtenidos de las pendientes en las curvas de calibración, también indican una buena sensibilidad del sistema³⁹.

4.5.3 Precisión

- **Repetitividad:** Se determinó por medio de las soluciones de ácido abiético de las curvas de trabajo. Los datos de desviación estándar y de RSD se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Datos de áreas y sus respectivas desviaciones estándar para ácido abiético

CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	%RSD
1	33291	33172	33260	33241	61,733	0,186
2	68452	69121	69989	69187,333	770,644	1,114
4	132490	129156	130140	130595,333	1713,005	1,312
6	212536	210504	210776	211272	1103,072	0,522
8	260827	270441	264002	265090	4898,475	1,848
10	322300	320349	320534	321061	1076,985	0,335
20	687107	689923	695720	690916,667	4391,637	0,636
40	1228456	1220947	1221867	1223756,667	4095,656	0,335

60	1950109	1934102	1948793	1944334,667	8886,144	0,457
80	2642700	2651820	2596483	2630334,333	29668,640	1,128
100	3333011	3384041	3373693	3363581,667	26975,814	0,802
200	6425113	6490429	6437570	6451037,333	34678,116	0,538
400	12750883	12864534	12686570	12767329	90114,646	0,706
600	18842350	18678365	18717869	18746194,67	85583,454	0,4565
800	24165002	24202109	23935036	24100715,67	144677,387	0,600
1000	30322625	30118687	30207955	30216422,33	102232,327	0,338

Los valores de %RSD obtenidos están entre 0.186 y 1.848%, demostrando que el método es repetitivo dentro del rango de concentraciones analizado, ya que no sobrepasa el valor estipulado para el ácido abiético, que corresponde al 5%.

- **Reproducibilidad.** Se utilizaron soluciones patrón de ácido abiético de 6, 60 y 600 ppm, para hallar la desviación estándar y la desviación estándar relativa, cuyos datos se encuentran reportados en la tabla 21. Los resultados muestran que el método es reproducible, ya que los %RSD son inferiores al 5%.

Tabla 21. Datos de reproducibilidad del método.

CONCENTRACIÓN	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	ÁREA PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	%RSD
6	201546	203268	204187	203000,333	1340,692	0,660
60	1978263	1941376	1967110	1962249,67	18917,712	0,964
600	18769425	18775546	18778236	18774402,33	4515,463	0,024

4.5.4 Exactitud del método. La exactitud del método se evaluó mediante el test de student, con algunas de las concentraciones de las curvas de trabajo. En la tabla 22, se encuentran reportadas las concentraciones utilizadas para hallar los porcentajes de recuperación correspondientes, y así evaluar la exactitud en cada curva con sus respectivos valores de t_{obt} .

Tabla 22. Datos de exactitud del método de extracción

Concentración A. Abiético (ppm)	%RECUPERACIÓN	R promedio	S	RSD	t_{obt}
---------------------------------	---------------	------------	---	-----	-----------

2	99.486	99.621	100.166	99,758	0.460	0.361	1.163
20	100.106	99.179	99.703	99,663	0.465	0.466	1.250
200	99.824	99.984	99.831	99,980	0.090	0.090	2.303

La exactitud en el método existe siempre y cuando el t_{obt} sea menor que el t_{tabla} . El t_{tabla} se determinó, teniendo en cuenta el número total de datos obtenidos con las inyecciones realizadas. Por lo tanto, el t_{tabla} tiene un valor de 4.303 para dos grados de libertad y un 95% de confianza. Los valores de t_{obt} (véase la tabla 22), demuestran la exactitud del método, ya que son inferiores al valor de t_{tabla} ⁴⁰.

4.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA COLOFONIA OBTENIDA A PARTIR DE LA RESINA DE LA ESPECIE *Pinus patula*.

En el análisis cromatográfico de la muestra de *Pinus patula*, se encontró ácido abiético a un tiempo de retención de 9.178 minutos, como se muestra en la figura 28, cuyo valor es muy similar al del patrón, el cual fue de 9.042 minutos. Para corroborar que la señal obtenida con la muestra corresponde al ácido abiético se tomaron algunos tiempos de retención de ácido abiético obtenidos, para calcular el intervalo de confianza. Los datos se muestran en la tabla 23.

Figura 27. Cromatograma de muestra de colofonia de *Pinus patula*

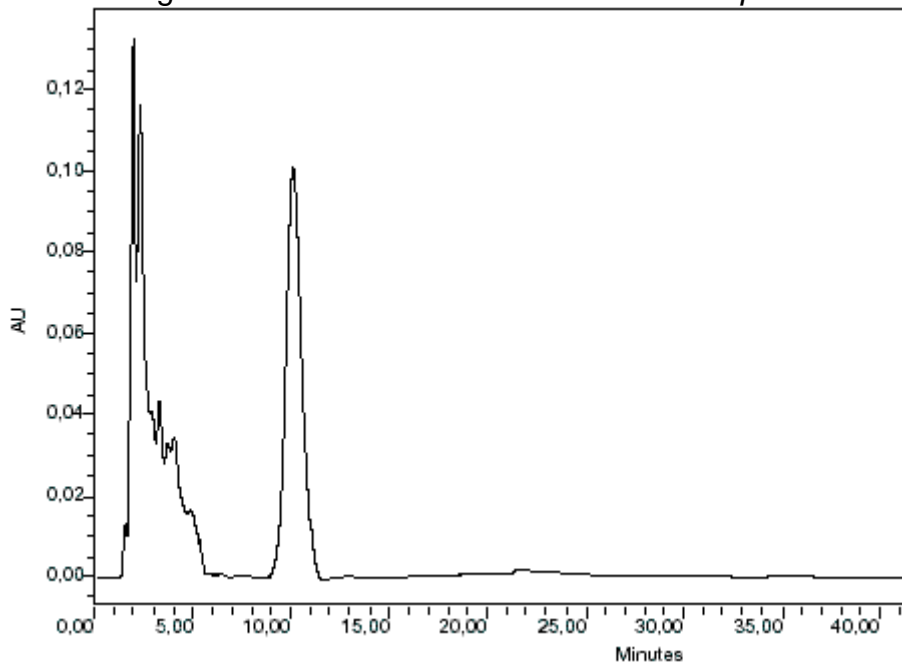
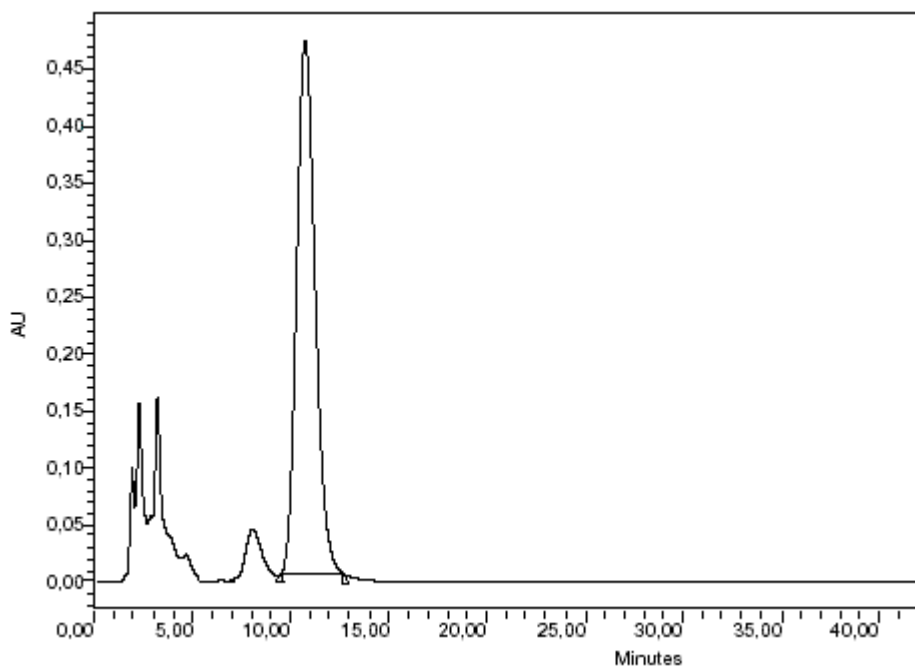


Tabla 23. Intervalo de confianza para Ácido abiético

tr promedio (min)	Desviación estándar	Intervalo de confianza 95%, 5° libertad
9.148	0.689	± 0.723

Como parámetro de comparación se utilizó una muestra de colofonia comercial, la cual fue inyectada con las mismas condiciones del patrón y de la muestra, obteniéndose un tiempo de retención de 9.245 para el ácido abiético. El cromatograma correspondiente a la colofonia comercial se muestra en la figura 29.

Figura 28. Cromatograma de muestra de colofonia comercial



Al hacer la interpolación del área de los picos cromatográficos de colofonia de *Pinus patula* y colofonia comercial en la curva de calibración entre 100 y 1000 ppm, se halló la concentración real de ácido abiético para cada una de las muestras, las cuales se reportan en la tabla 24, con sus respectivos tiempos de retención. Las muestras fueron inyectadas por triplicado.

Tabla 24. Concentración real de ácido abiético en colofonia de *Pinus patula* y comercial

MUESTRA	t _R	CONCENTRACIÓN AL INTERPOLAR (ppm)	CONCENTRACIÓN REAL (mg)	PORCENTAJE (%)
Colofonia <i>P. patula</i>	9.178	195.930	4.902	14.85
Colofonia comercial	9.245	947.974	8.720	26.42

La baja concentración de ácido abiético hallada en la colofonia de *P. Patula*, puede deberse a diversos factores relacionados con la coloración oscura de la colofonia obtenida. Éstos van desde la especie de pino y métodos de extracción de resina, hasta los procedimientos de laboratorio, e incluso un inadecuado almacenamiento de las muestras. Lo anterior conlleva a alteraciones en la composición de la colofonia, debido a la inestabilidad de algunos de los ácidos presentes. Los ácidos del tipo abiético, con sistema de dobles enlaces conjugados, absorben fácilmente oxígeno mientras que los del tipo pimárico son

relativamente inertes. Una muestra de ácido abiético puro, expuesta al aire por algún tiempo, toma un color oscuro, formándose algunos intermediarios. En la oxidación de dienos, se forman peróxidos y grupos hidroxilo. Indudablemente, las reacciones siguen más adelante y se forma una mezcla compleja de productos de oxidación en que no siempre queda intacto el núcleo hidrofenantreno y que no son fáciles de caracterizar. Es probable que ésta también sea la causa por la cual no fue observado el compuesto que aparece al lado del ácido abiético en la colofonia comercial (véase figura 28) y en la muestra analizada por el IPC, de residuos de colofonia en placas de instalaciones eléctricas (véase sección 2.4) a 241 y 240 nm, respectivamente, cuya señal correspondería al ácido neoabiético. Los demás componentes de la colofonia pueden determinarse variando la longitud de onda, con los patrones correspondientes^{41,42}.

Las investigaciones realizadas por Sadhra y Foulds, acerca de la oxidación de ácidos de resina en colofonia y sus implicaciones en los análisis, corroboran lo dicho anteriormente. Sus investigaciones se basan en la dermatitis por contacto, causada por la colofonia. Ellos afirman que los ácidos de resina sufren una oxidación progresiva y sustancial, y que la actividad dermatológica de las muestras preparadas, incrementa significativamente con el tiempo. Analizaron mediante Cromatografía de gases, muestras de colofonia fresca y de colofonia comercial, preparada para sus ensayos de laboratorio; encontrando que ambas contenían los mismos ácidos resínicos, pero la concentración de ácidos de resina del tipo abiético, era más baja en la colofonia comercial. Por lo tanto, se infiere que la degradación de los ácidos resínicos es debida a su oxidación atmosférica, la cual ocurre durante la preparación y almacenamiento de la colofonia comercial usada en sus ensayos. La susceptibilidad de los ácidos de resina a la oxidación atmosférica, fue demostrada analizando una muestra de goma de resina portuguesa fresca, la cual fue expuesta al aire y a la luz. Se encontró que la mayoría de los ácidos resínicos sufrieron oxidación y se presume que la concentración de los ácidos de resina oxidados incrementó correspondientemente. Dichos ácidos oxidados resultaron ser dermatológicamente más activos, que los ácidos resínicos no oxidados⁴³.

5. CONCLUSIONES

Los rendimientos obtenidos de trementina (13.5-14.6%) y colofonia (70.3-74.6%) mediante destilación de resina de *Pinus patula* son aceptables, comparados con los reportados por la Universidad de Pinar del Río en Cuba, los cuales están entre 64-70% para colofonia y 16-20% para trementina.

Exceptuando la prueba de color, los resultados de las pruebas de calidad para resina y colofonia se acercan mucho a los valores teóricos, lo cual significa que el método de destilación empleado fue apropiado..

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector Ultravioleta, resulta ser una buena técnica para la determinación del ácido abiético, obteniéndose bajos límites de detección, además de un corto tiempo de análisis. Los buenos resultados de linealidad, reproducibilidad, exactitud y precisión, corroboran la eficacia de la técnica CLAR.

El bajo contenido de ácido abiético hallado en colofonia de la especie *Pinus patula* puede tener diferentes causas como la especie de pino, las condiciones del suelo o un inadecuado tratamiento de las muestras, lo que incluye, almacenamiento de la resina y de la colofonia. Ésta última, ya sea en estado sólido o en solución, puesto que la susceptibilidad del ácido abiético al oxígeno atmosférico y la luz origina su conversión a algunos de sus isómeros.

6. RECOMENDACIONES

Es importante realizar los análisis de laboratorio con muestras frescas debido a la inestabilidad de los ácidos resínicos, lo cual hace que la calidad los productos obtenidos disminuya considerablemente. Debido a esto, es necesario conservar tanto la resina como la colofonia a bajas temperaturas y protegidas de la luz.

Se pueden emplear sustancias químicas para obtener colofonias más claras como ácido oxálico, furfural, entre otras, realizando los respectivos análisis de calidad para estudiar los resultados.

Determinar los demás componentes de la colofonia, es decir, los ácidos de los tipos abiético y pimárico, mediante la técnica HPLC u otro tipo de técnicas.

Obtener colofonias modificadas mediante reacciones químicas para mejorar su estabilidad, aumentando su calidad.

Analizar cada una de las etapas que conllevan a la obtención de trementina y colofonia; desde la extracción de resina, hasta los análisis de laboratorio; de manera que se puedan optimizar las condiciones con el fin de mejorar la calidad de los productos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. DE LA PEÑA, G. e ILLSLEY, C. Los Productos Forestales no maderables: su potencial económico, social y de conservación. México, 2001.
2. BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Departamento de Farmacología y Facultad de Farmacia. Primera edición. Editorial Acribia S.A. España, 1991. p 267.
3. COPPEN, J and HONE, G. Gum naval stores: Turpentine and rosin from pine resin. Non-Wood Forest Products 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. Chapters 1 and 8, Rome, Italy. 1995.
4. TORRES, R. Juan M. Especies con Usos no Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Centro de Investigación y Docencia Económicas (CIDE). México. 1999.
5. FRISK, Torsten. Memoria - Consulta de expertos sobre Productos Forestales no Madereros para América Latina y el Caribe. Dirección de Productos Forestales, FAO, Roma Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Serie Forestal N° 1. Parte 3: CUBA: Situación del manejo, cosecha, procesamiento, mercadeo y comercialización. Aspectos institucionales, contribuciones socioeconómicas y dimensiones ambientales. Santiago, Chile. 1995.
Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/t2354s/t2354s00.htm#Contents>
6. COPPEN. Op. Cit., Chapter 1. Production, trade and markets. Rome. Italy 1995.
7. KIRK, Raymond. Enciclopedia de Tecnología Química Aplicada. UTEHA. Tomo V, México. 1967. p 49.
8. COPPEN, Op. cit., Chapter 1. Production trade and markets. Rome. Italy 1995.
9. KIRK, Op, cit. México. 1967. p 602.
10. Disponible en internet: <http://www.pieplow-brandt.de/spain/Programme%20en%20ESPAGNOL%20version%2024%20juillet%2003.pdf>
11. Disponible en internet: http://www.esimez.ipn.mx/aca_quimi/q2dpf/Apuntes%20de%20soldadura...pdf

12. Disponible en internet: <http://loctite.fast.de/wwdh/es/i197ch11.htm>
13. Viqueira, A. Composición de Laca Fluorada para uso Dental. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. REPUBLICA DE CUBA. CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS. 1984, p 4.
14. Disponible en internet: <http://www.proz.com/kudoz/89994?float=1>
15. Disponible en internet: http://www.granelderivados.com/productos_colofonia_est.htm
16. KIRK, Op. Cit., México. 1967. p 53.
17. COPPEN, Op. cit., Chapter 5. Rome. Italy 1995.
18. PASTOR, J y GALLO, J. Estudio de la Calidad de la Resina de *Pinus caribaea var caribaea* y sus componentes. Noticias Químicas, XII Congreso Colombiano de Química, La química Alternativa de desarrollo en Colombia- Bogotá, Colombia 2001. p 59.
19. PASTOR, J y NÚÑEZ, S. Estudio de la Resina de *Pinus caribaea var caribaea* y sus componentes. Universidad de Pinar del Río. Cuba. 2001. Disponible en Internet: <http://www.uct.pinar.cu./prem.php>
20. SKOOG, D. Análisis Instrumental. Ed. McGraw-Hill. Cuarta edición. España, 1997. p 731.
21. VIEILLESZAZES, C. Analytical Chemistry applied to study of ancient resinous materials. Francia, 2003. p1.
22. The Intitute for Interconnecting and Packaging Electronic Circuit IPC-TM-650. TEST METHODS MANUAL. Rosin Flux Residue Analysis-HPLC Method.1995 Disponible en Internet: <http://dcchapters.ipc.org/html/2.3.27.1.pdf>
23. Occupational Safety and Health Administration OSHA. U.S. Department of Labor. Disponible en Internet: www.osha.gov/dts/chemicalsampling/toc/toc_chem_chemsamp.html
24. HROBOŇOVÁ K., LEHOTAY, J., SKAČÁNI, I., y ČIŽMÁRIK, J. HPLC Determination and MS Identification of Dehydroabietic Acid and Abietic Acid in Propolis. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. Volume 28, Number 11 / 2005. p 1725 – 1735.

25. ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS : Standard Test Method for Resin Acids in Rosin by Gas-Liquid Chromatography. Editorial Starff. Vol. 06.03 1991. Designation: D 3008 – 90. p 381-384.
26. KARLBERG, A y MAGNUSSON, K. Rosin components identified in diapers. Contact Dermatitis. Division of Occupational Dermatology, National Institute of Occupational Health. Solna, Sweden. 1996 Vol. 34, p 176-180.
27. SADHRA S, FOULDS IS and GRAY CN. Identification of contact allergens in unmodified rosin using a combination of patch testing and analytical chemistry techniques. Institute of Occupational Health, University of Birmingham, Edgbaston, U.K. Br J Dermatol. 1996 Apr;134(4):662-8.
28. _____ High-performance liquid chromatography of unmodified rosin and its applications in contact dermatology. Institute of Occupational Health, University of Birmingham, Edgbaston, U.K. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1997 Oct 24;700.
29. SHAO, LP., GÄFVERT, E., KARLBERG, A –T, NILSSON, U. y NILSSON, JLG. The allergenicity of glycerol esters and other esters of rosin (colophony). Contact Dermatitis. Analytical Chemistry. 1993. p 229-234.
30. PALTA, J. Potencial Productivo de Oleorresina de las Especies Pinus patula Y Pinus oocarapa en el Municipio de Cajibío, Departamento del Cauca. Popayán. 2003. 43-54 p. Trabajo de Grado (Ingeniero Agroindustrial). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial.
31. ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS Editorial Starff. Philadelphia. Vol. 06.03 1991. p. 82, 84, 150-152.
32. KIRK, Op. Cit., México. 1967, p 63.
33. Antioxidants Center. Tackifiers natural and synthetic. Natural Tackifiers Stabilization. Disponible en Internet: <http://specialchem4adhesives.com/tc/antioxidants/index.aspx?id=nattackifiersstab>
34. Disponible en internet: <http://www.chemicaland21.com/industrialchem/performancepolymer/ROSIN,%20GUM.htm>
35. COPPEN, Op. Cit., Chapter 3. Rome. Italy 1995.
36. KIRK, Op. Cit., México. 1967, p 60-63.
37. WADE, JR. Química Orgánica. Segunda Edición. PRENTICE-HALL HISPANOAMERICANA, S.A. México. 1993. p 480-498

- 38: HARRIS, D. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 1992. p 631-632.
39. SKOOG, D. Op. Cit., España,. 1997. p 7,
40. QUATTOCCHI, O., ADELAIIRA, S. y LABA, R. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina. 1992, p 313-325.
41. KIRK, Op. Cit., México. 1967. p 63.
42. IPC-TM-650. TEST METHODS MANUAL. Originating Task Group. The Institute for Interconnecting and Packaging Electronic Circuits. 2215 Sanders Road • Northbrook, IL 60062-6135. Rosin Flux Residue Analysis—HPLC Method. Number 2.3.27.1. 1995, p 1-3.
43. SADHRA, FOULDS and GRAY. Op. Cit., Oxidation of resin acids in colophony (rosin) and its implications for patch testing. Contact Dermatitis. 1998 Aug;39(2):58-63.

ANEXOS

ANEXO A

ECUACIONES PARA ANÁLISIS DE CALIDAD DE RESINA Y COLOFONIA

1) Determinación del Porcentaje de Humedad para Resina

$$\%H = W_{H2O} \times 100 / W_{\text{muestra}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

W_{H2O} = peso del agua obtenida y

W_{muestra} = peso de la muestra

2) Índice de saponificación (IS)

$$IS = [(B - A)N \times 56.1]/C \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

A = volumen de H_2SO_4 requerido para la titulación de la muestra,

B = volumen de H_2SO_4 requerido para la titulación del blanco,

N = normalidad del H_2SO_4 y

C = peso de la muestra

3) Índice de Acidez (IA)

$$IA = (AN \times 56.1)/B \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

A = volumen de solución alcali requerida para la titulación de la muestra,

N = normalidad de la solución álcali, y

B = peso de la muestra.

4) Contenido de Materia Insaponificable (MI)¹

$$MI = [(A - (CN \times 0.302))/B] \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

A = peso del residuo,

B = gramos de la muestra usada,

C = volumen de la solución álcali, y

N = normalidad d la solución álcali.

¹ ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS : Editorial Starff. Vol. 06.03 1991. p 82, 84, 150-152.

ANEXO B

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

1) LINEALIDAD

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez. Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar¹. Para ajustar la mejor línea recta, se emplea el método de mínimos cuadrados, donde se supone que existe una relación lineal entre el área de los picos (Y) y la concentración (X) que viene dada por la ecuación

$$y = mx + b \quad (\text{Ecuación 5})$$

en la que **m** es la pendiente y **b** la ordenada en el origen.

También se supone que cualquier desviación de los puntos individuales respecto a la línea recta, proviene del error en la medición del área y que no existe error en los valores de X, esto es, las concentraciones de las soluciones estándar se conocen exactamente².

2) SENSIBILIDAD

Límite de detección. Corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc). Dicha concentración puede detectarse para un nivel de confianza dado, proporcionando una señal igual a la señal del blanco o señal de fondo, Y_B , mas 3 veces la desviación estándar, S_B , y se calcula así:

¹ QUATTOCCHI, O., ADELAIRO, S. y LABA, R. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina. 1992, 312 p.

² SKOOG, D. Análisis Instrumental. Ed. McGraw-Hill. Cuarta edición. España, 1997. 832,833 p.

$$Y = Y_B + 3 S_B \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde Y es el valor del límite de detección, este valor se reemplaza en la ecuación 5, y donde x es la concentración del límite de detección.

Límite de cuantificación. Es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración. Se expresa matemáticamente así:

$$Y = Y_B + 10 S_B \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde S_B es la desviación estándar del blanco, Y_B es la respuesta del blanco³. El límite de cuantificación es el resultado de reemplazar el valor de Y en la ecuación 7.

3) PRECISIÓN

La precisión describe la reproducibilidad de los resultados, esto es, la concordancia entre los valores numéricos de dos o más mediciones repetidas, o que se han realizado exactamente de la misma forma. En general, la precisión de un método analítico se obtiene con facilidad simplemente repitiendo la medición. Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizan tres términos muy conocidos: la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación.

Media de la muestra \bar{X} . La media, también denominada promedio, es la suma de los valores medidos dividida entre n , el número total de valores, y se define por la ecuación⁴:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 8})$$

³ Op. Cit., QUATTOCCHI, O., ADELAIIRA, S. y LABA, R.. Argentina. 1992, 322-323 p.

⁴ HARRIS, D. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México 1992, 48 p.

Desviación estándar S. La desviación estándar proporciona una medida estadísticamente significativa de la precisión de una población de datos, así pues

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Desviación estándar relativa RSD. Es el porcentaje de la desviación estándar. Tanto la desviación estándar, como la desviación estándar relativa, permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida. El RSD se calcula así:

$$RSD = \frac{S \times 100}{\bar{X}} \quad (\text{Ecuación 10})$$

4) EXACTITUD

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Para determinarla puede utilizarse un ensayo t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando el t experimental, t_{obt} , que se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido. El valor de t_{obt} puede calcularse como

$$t_{obt} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{RSD} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde R es la recuperación porcentual y t_{obt} es el valor de t obtenido experimentalmente.

Si t_{obt} resulta menor que el t tabulado, el método tiene la exactitud requerida para ese ámbito de confianza⁵.

⁵ Op. Cit., QUATTOCCHI, O., ADELAIIRA, S. y LABA, R. Argentina. 1992, 319-320 p.

ANEXO C

CROMATOGRAMAS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA FASE MÓVIL

Figura 1. Cromatograma de colofonia comercial. ACN-H₂O-H₃PO₄ (70:30:0.1)

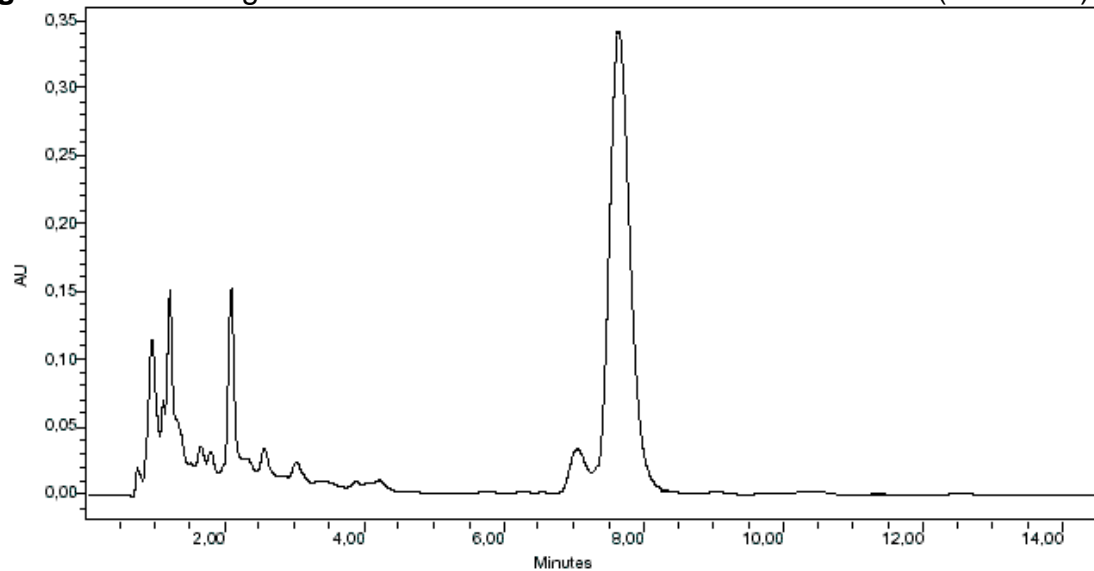


Figura 2. Cromatograma de colofonia comercial. ACN-H₂O-H₃PO₄ (80:20:0.1)

