
Capítulo 11

Utilización de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM) para el Análisis de las Pastas Estudiadas

RESUMEN

La microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) son dos técnicas que permiten el análisis microscópico de muestras de fibras para papel. Estos métodos se proponen para poder observar los cambios en la superficie de la fibra que tienen lugar como consecuencia de la aplicación de diferentes tratamientos de blanqueo. La información obtenida es muy interesante sobre todo para poder interpretar el efecto de las enzimas en las fibras celulósicas. La dificultad de TEM en comparación con SEM, radica en la interpretación de las imágenes obtenidas. Los cambios morfológicos de las fibras pueden ser estudiados con mayor facilidad mediante la técnica SEM.

INTRODUCCIÓN

El comportamiento de las pastas para papel durante el proceso de blanqueo, el efecto de la actuación de diferentes agentes de blanqueo y las propiedades físicas desarrolladas por estas pastas, pueden estar relacionados con el estado de la superficie de la fibra, es decir, con la morfología superficial de las fibras (SACHS *et al.*, 1990; SARBHARWAL *et al.*, 1994; RICHTER *et al.*, 1996; SIGOILLOT *et al.*, 1997; GARG *et al.*; 1998; ZHANG *et al.*, 1998). Siguiendo en la misma línea del Capítulo anterior, se pretende, en el presente estudio, utilizar estas técnicas para conseguir mayor información sobre los beneficios o desventajas de los diferentes reactivos utilizados para el blanqueo TCF de pastas de eucalipto y de paja de trigo. En este capítulo se han utilizado técnicas de microscopía, en concreto la microscopía electrónica de barrido (SEM: Scanning Electron Microscopy) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM: Transmission Electron Microscopy).

Aproximadamente desde los últimos 50 años, el uso de la microscopía electrónica y sus técnicas auxiliares se han extendido enormemente, teniendo aplicaciones en muchos campos científicos, particularmente en la medicina y en investigaciones de ámbito químico y físico. Actualmente, el uso de la microscopía electrónica abarca desde la investigación puramente académica a aplicaciones de control de proceso en las industrias. De forma similar, la microscopía electrónica ha sido y continúa siendo aplicada con grandes éxitos en la investigación de pasta y papel con el propósito de conseguir una mayor comprensión de la estructura de la fibra (DUCHESNE y DANIEL, 1999).

En el campo de la ciencia de la madera, uno de los más importantes retos ha sido averiguar la estructura de las células de la madera caracterizándolas *in situ* tal como se encuentra en el tejido original. Basándose en análisis químicos y en observaciones con microscopía electrónica, han sido propuestos diferentes modelos que describen la organización estructural y química de las paredes de las fibras de madera, pero algunos aspectos de su ultraestructura todavía permanecen sujetos a controversia.

Además de las funciones estructurales y fisiológicas en los árboles, las fibras también son un elemento clave en la estructura del papel. Después de la desfibración y durante el drenado, prensado y secado, las fibras se unen entre ellas a través de interacciones entre sus superficies, dando lugar a propiedades de resistencia y cohesión en el papel. Por tanto, es de sumo interés conocer la estructura superficial y fisicoquímica de las fibras durante el proceso de preparación de pastas y fabricación del papel, con el fin de poder predecir las propiedades y calidad del producto final. Durante este proceso, las fibras están sometidas a considerables interacciones físicas, químicas y térmicas, en que algunas de las cuales tiene lugar entre las superficies de las fibras y el agua, aditivos químicos o enzimas. Estas interacciones están condicionadas por las características morfológicas y químicas de las fibras.

Basándose en la bibliografía (AITKEN *et al.*, 1990; MARTÍNEZ *et al.*, 1990 y 1994; BARRASA *et al.*, 1992 y 1995; KUNDU *et al.*, 1993; BUSCHLE-DILLER *et al.*, 1994 (a) y (b); HAYASHI *et al.*, 1995; PHAM *et al.*, 1995; UHLIN *et al.*, 1995; GOODELL *et al.*, 1998; BUSTAMANTE *et al.*, 1999; DUCHESNE y DANIEL, 1999; HEUX *et al.*, 1999; WILLIAMS y DRUMMOND, 2000), parece ser que en concreto, estas técnicas SEM y TEM son aptas para realizar un estudio microscópico de las fibras celulósicas, puesto que permiten observar cambios superficiales en la fibra, gracias a que proporcionan imágenes con gran aumento, elevada resolución y gran amplitud de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para analizar las muestras después de cada etapa de blanqueo de las siguientes secuencias TCF: XOZP, XOAZP, XOZRP,

XOAZRP, OAZ₁RP y OAZ₂RP de la pasta de eucalipto (Capítulos 6 y 8), y X de la pasta de paja (Capítulo 7) incluidas las pastas crudas de cada materia prima; y las secuencias ECF: ODP, OXDP, XODP, DEpD y XDEpD de pasta de eucalipto.

En el caso de la microscopía electrónica de transmisión, únicamente se analizaron muestras de paja (datos no mostrados por difícil interpretación), y la muestras X, O y XO de la pasta de eucalipto.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

De las pastas a analizar se realizaron hojas de laboratorio para obtener muestras que tuvieran un contenido en agua en equilibrio permanente con el aire. Debido a la naturaleza aislante de la celulosa, las muestras deben ser cubiertas superficialmente por un film conductor de electrones. En este trabajo fueron recubiertas mediante un film de oro. Posteriormente, las muestras fueron examinadas mediante un microscopio electrónico JEOL JSM-6400 utilizando de 5 a 15 kV. Estos análisis se llevaron a cabo en los Serveis Científico-Tècnics de la Universidad de Barcelona y en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona de la Universidad Politècnica de Catalunya.

Tanto para SEM como para TEM, las muestras de pasta deben ser secadas previamente. La principal razón de esto es el elevado vacío que debe ser suministrado a la columna del microscopio para permitir que electrones primarios migren de su fuente de emisión con una energía suficiente para interactuar con la superficie de la fibra y poder dar señales. Estas señales de electrones son generalmente detectadas con detectores de electrones secundarios (SE) y/o electrones dispersados (BSE).

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras a analizar se colocaron durante 2 horas al vacío, realizando un secado previo durante media hora a 80°C y posteriormente se llevó a cabo una inclusión (polimerización) con resina Spurr (resina de tipo epoxi utilizada normalmente en el análisis de los vegetales) durante 24 horas a 90°C (MARTÍNEZ *et al.*, 1990; BARRASA *et al.*, 1992). Antes de examinar las muestras con el microscopio, se realizaron secciones semifinas (0,5µm) que fueron teñidas con azul de metileno para ser observadas en un microscopio óptico a fin de escoger las zonas más interesantes y en mejor estado. En las muestras elegidas, se realizaron secciones ultra finas para su posterior análisis en el microscopio de transmisión PHILIPS 301. Estos análisis se llevaron a cabo en los Serveis Científico-Tècnics de la Universidad de Barcelona.

El principio de TEM es que los electrones que penetran a través de la muestra estudiada son utilizados para la formación de la imagen, mientras que en SEM, se utilizan los electrones que son principalmente reflejados en la superficie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera técnica utilizada fue SEM. Posteriormente, con el fin de reunir más información se realizaron algunos análisis con TEM. Por ello, se divide este apartado en dos partes, correspondientes a los estudios realizados con SEM y finalmente con TEM.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Existen en la bibliografía numerosas aplicaciones de la microscopía electrónica de barrido dentro de la industria de pasta y papel. Publicaciones que tratan diferentes temas, ya sea la distribución de la deslignificación (SAKA *et al.*, 1978; GARDNER *et al.*, 1982; MARTÍNEZ *et al.*, 1990), la distribución de cargas y pigmentos (WALBAUM 1972; CETNAR y HEITUR, 1975; WALBAUM y ZAK, 1976; VOILLOT 1982; PETTERSSON *et al.*, 1987; ORMEROD *et al.*, 1988), la situación de depósitos, manchas e impurezas (AXEGARD, 1987), la superficie de papeles y cartones (ELDRED y HALLER, 1977; VOILLOT, 1983; AITKEN *et al.*, 1990), y el estado de la superficie de fibras de pastas para papel (SACHS *et al.*, 1990; BUSCHLE-DILLER *et al.*, 1994 (a) y (b); SABHARWAL *et al.*, 1994; PHAM *et al.*, 1995; RICHTER *et al.*, 1996; GARG *et al.*, 1998; BUSTAMANTE *et al.*, 1999).

La microscopía electrónica de barrido, gracias a su gran profundidad de campo y a sus aumentos mucho mayores que el microscopio óptico, aporta gran información visual del estado de la muestra que se analiza.

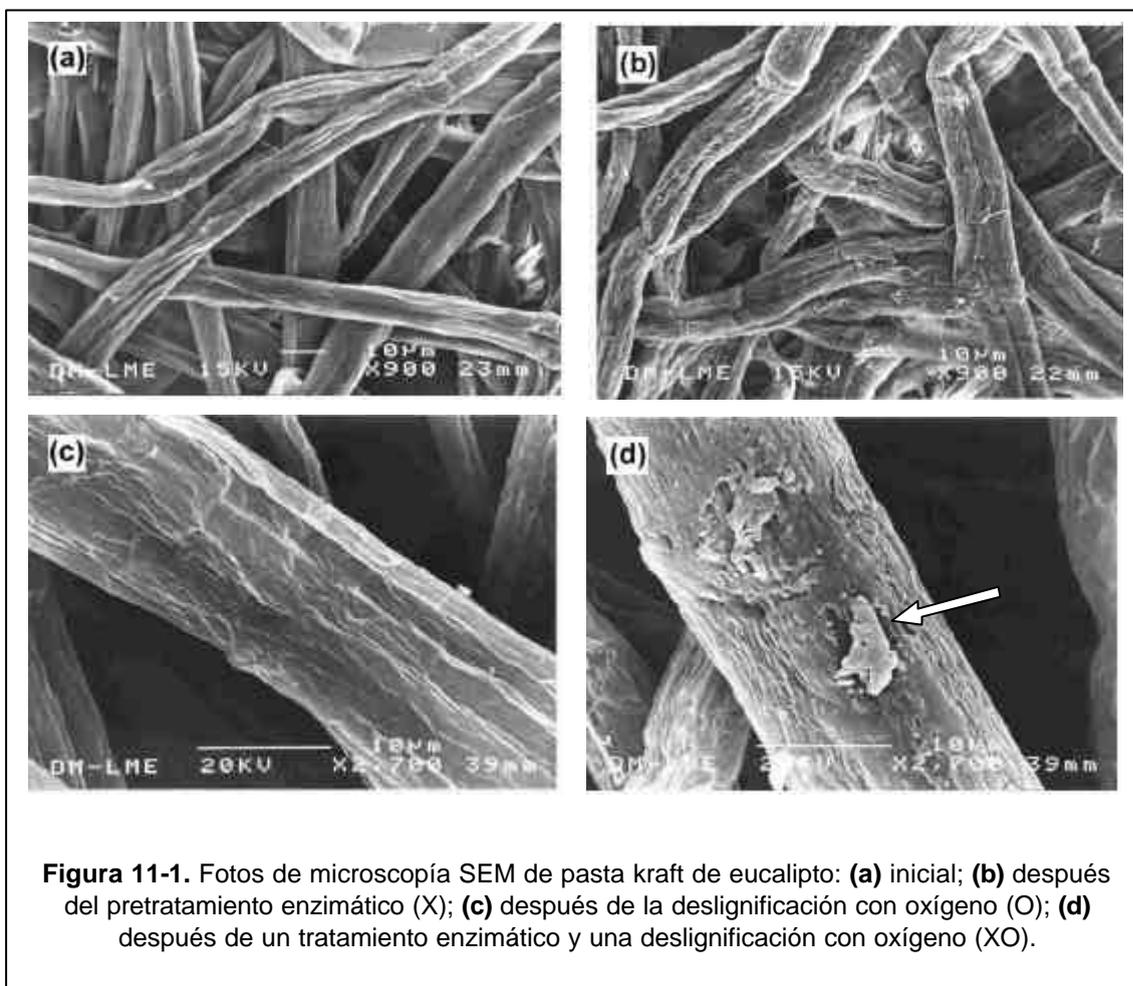
Efecto del pretratamiento enzimático en la superficie de las fibras de pastas TCF de eucalipto

Con el fin de obtener una mayor comprensión del efecto del tratamiento enzimático en la blanqueabilidad de las pastas, se realizó un estudio microscópico mediante SEM de las muestras X, O, XO y cruda de pasta de eucalipto (estudiadas en el Capítulo 8) cuyas fotos se presentan en la Figura 11-1.

Las fotos (a) y (b) de la Figura 11-1 muestran la pasta kraft de eucalipto cruda y pretratada con xilanasa (X), respectivamente. Se observa que las fibras de la pasta cruda son uniformes y bastante rectas, con una superficie lisa y pulida, dando una apariencia de suavidad. Además, no presentan ningún tipo de fibrilación externa ni de formación de fibrillas. Por el contrario, las fibras de la pasta X no aparecen tan rectas y su superficie es más rugosa, heterogénea y estriada, evidenciando que está en proceso de *peeling*, lo que da lugar a un cambio morfológico en la superficie de la fibra. Parece incluso percibirse la formación de surcos o hendiduras en determinadas zonas de las fibras, pero no apareciendo de una forma uniforme lo que induce a pensar que surgen en las zonas menos cristalinas de la fibra o donde se encontraban los xilanos precipitados.

Este efecto *peeling* también coincide con las imágenes obtenidas por PHAM *et al.* (1995) en pasta de eucalipto blanqueado con una xilanasa comercial (Pulpzyme HB), donde, en las fibras tratadas con enzima, advirtieron un cambio superficial que no aparecía en las fibras no

tratadas. GARG *et al.* (1998) también observaron una modificación de la superficie de fibras de pasta kraft de abedul tratadas con preparaciones de xilanasas libres de actividad de celulasa.



En las imágenes (c) y (d) de la Figura 11-1 se muestran las fibras después de la deslignificación con oxígeno de la pasta sin tratar (O) y de la tratada (XO), respectivamente. Como puede observarse, la pasta O muestra una superficie lisa y pulida, mientras que las fibras de la pasta XO son más rugosas y estriadas, e incluso puede verse una porción de la superficie que parece desprenderse de la misma fibra dejando un surco en su lugar. La pasta XO muestra una descamación que da lugar a hendiduras en la superficie de la misma, las cuales permitirán una mejor penetración de los reactivos en posteriores etapas de blanqueo.

En el Capítulo 8, en el que se realiza un estudio del efecto del pretratamiento enzimático en las propiedades de las pastas y de los efluentes, y en las propiedades físicas de los papeles,

se observó un incremento en la facilidad de blanquear y deslignificar cuando se aplicaba un tratamiento enzimático (efecto “estimulador” del blanqueo). Se comentan en el mismo capítulo, diferentes interpretaciones sobre la actuación de las xilanasas.

Es conocido que durante la cocción kraft se produce una precipitación de cadenas cortas de xilanos en la superficie de la fibra. En cierto modo, estos xilanos que se redepositan en la fibra actúan como una barrera física a la penetración de agentes de blanqueo. Las xilanasas catalizan la hidrólisis de xilanos, así que pueden hidrolizar estos xilanos precipitados, desprendiéndolos de la superficie de la fibra y por tanto, eliminando esta barrera física, por lo que los reactivos pueden penetrar más fácilmente, de manera que se facilita el blanqueo de la fibra y se reduce la cantidad de reactivo necesario. Esta separación de xilanos es lo que se ha observado en las fotos antes comentadas, donde incluso se ven escamas de fibra que se desprenden dando lugar a la formación de surcos o grietas por las que los agentes de blanqueo pueden penetrar más fácilmente.

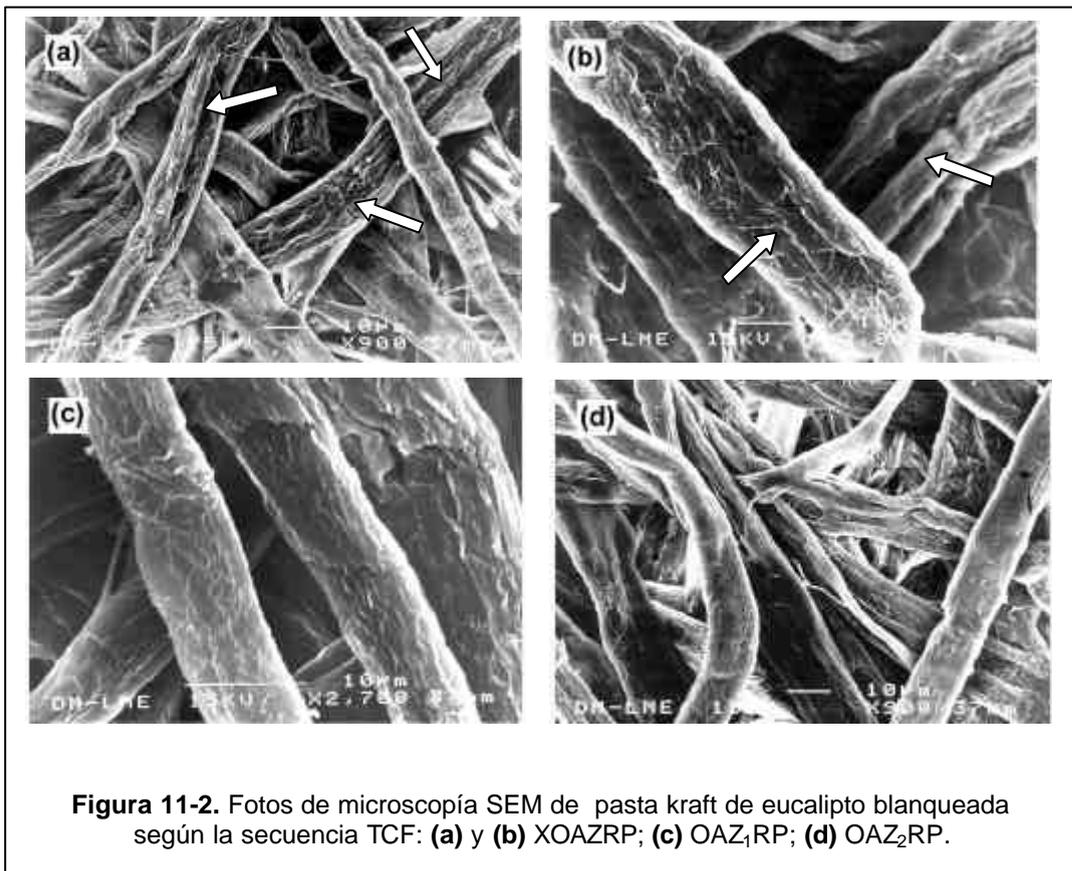
Por consiguiente, durante el pretratamiento enzimático se hidrolizan hemicelulosas, lo que justifica la elevada DQO que se obtiene en esta etapa (Capítulo 8), y se ha corroborado que principalmente son xilanos en el estudio de hidratos de carbono por HPLC (Capítulo 10).

En la Figura 11-2 se muestran las fotos de pasta kraft de eucalipto después de las secuencias XOAZRP, OAZ₁RP (ambas con 0,4% ozono consumido) y OAZ₂RP (con 0,55% ozono consumido) correspondientes al Capítulo 8. A simple vista, las cuatro imágenes parecen muy similares, mostrando fibras más o menos homogéneas que han sufrido alguna modificación superficial. Sin embargo, en las fotos (a) y (b) pertenecientes a la pasta con tratamiento enzimático (XOAZRP), parecen destacarse grietas o hendiduras que no se observan en las fotos (c) y (d) correspondientes a las pastas sin tratamiento enzimático (OAZ₁RP y OAZ₂RP), lo que corrobora de nuevo lo anteriormente comentado. Aunque sí puede concluirse que el efecto de la enzima que se ha observado en la superficie de la fibra, es más visible en los primeros estadios de blanqueo.

Cuando se estudiaban las propiedades físicas de estas pastas en el Capítulo 8, se obtenía un mayor índice de desgarrado a igualdad de índice de tracción en la pasta tratada (Figura 8-12 del mismo capítulo), que se intentaba justificar por una mayor fibrilación externa ya que favorece la resistencia al desgarrado. Sin embargo, en la pasta sin refinar (fotos antes comentadas) no se observa una mayor fibrilación externa en la pasta tratada con enzima con respecto a la no tratada. Pero sí que es muy probable que la pasta tratada tenga mayor facilidad a fibrilarse externamente durante el refinado; de hecho, GARCÍA (1998) observó este efecto en su estudio de la aplicación de celulasa en pasta de eucalipto. En realidad, las propiedades de las pastas sin refinar son muy similares en las secuencias, y es a medida que se refina que se observa un distanciamiento en la pasta tratada con enzima de las otras dos sin tratar.

Lo que ocurre con la xilanasas respecto al cambio morfológico de la fibra, no parece ser lo mismo que con otras enzimas, como puede ser la celulasa. BUSCHLE-DILLER *et al.* (1994) (a)

y (b)) efectuaron tratamientos enzimáticos con celulasa en fibras de algodón, lino y ramio, y encontraron, por ejemplo, que las fibras de lino no tratadas contenían mayor cantidad de fibrillas que las de algodón no tratadas. Después de 6 horas de incubación con la enzima, se eliminaba todo el material fibrilar, dando lugar a una superficie más lisa y limpia. Pero si se continuaba la hidrólisis, se empezaban a desarrollar estrías en la dirección radial de la fibra y las zonas de los nudos aparecían más marcadas, desintegrándose las fibras por estos nudos cuando se dejaban 48 horas en incubación con la enzima, por lo que sugieren que este tipo de enzimas parece reaccionar en la zona de los nudos, concentrándose la degradación en estas áreas. BLANCO *et al.* (1998) también aplicaron celulasa en pasta de paja observando cambios en la superficie de la fibra, pero sobre todo, detectaron unos elementos entre las fibras que probablemente se trataba de material de la propia fibra, desprendido a causa de la aplicación de la celulasa.



Efecto de la aplicación de un aditivo y/o un postratamiento en la superficie de las fibras de pastas TCF de eucalipto

Se realizó un estudio microscópico mediante SEM después del aditivo (A) y de cada etapa de blanqueo (Z, R y P) de las secuencias XOZP, XOAZP, XOZRP y XOAZRP obtenidas en el Capítulo 6 y de la secuencia OAZ₁RP del Capítulo 8. En las fotos obtenidas no se observa un claro efecto en la morfología de la fibra debida a la aplicación del aditivo y/o del postratamiento. Aunque en general parece que tanto el aditivo como el postratamiento actúan “limpiando” la fibra, es decir, eliminando fibrillas y escamas que se producen durante la deslignificación con oxígeno o el blanqueo con ozono. Esto coincide con los resultados de DQO en el efluente que muestran que se produce una disolución de materia orgánica. Y concretamente, concuerda también con los resultados de la determinación de hidratos de carbono por HPLC (Capítulo 10), en los que se obtiene una disminución del contenido en xilosa durante la aplicación del aditivo, que correspondería a la eliminación de fibrillas y escamas (o xilanos depositados sobre la fibra) que se observa en SEM. Respecto al postratamiento (R), los resultados de HPLC parecen depender de si se ha aplicado un aditivo o no en cuanto a la relación xilosa/glucosa (XYL/GLC), pero sí que los valores de DQO evidencian una eliminación de materia orgánica. Podría ser que si se ha aplicado el aditivo, esas fibrillas y escamas que aparecen durante la etapa O son eliminadas durante A por lo que durante la etapa R se sigue “limpiando” la fibra pero puede tratarse ya de hidratos de carbono de bajo peso molecular, lo que mantendría la relación XYL/GLC. Mientras que si no se ha aplicado el aditivo, esas fibrillas o escamas se eliminan durante el estadio R, además de poder eliminar otros hidratos de carbono de bajo peso molecular.

En la Figura 11-2 se muestran imágenes después de la etapa P, de las secuencias XOAZRP (a y b) y OAZ₁RP (c), y en Figura 11-3 se muestran fotos, también después de la etapa P, de las secuencias XOZP (a), XOAZP (b y c) y XOZRP (d). Si se comparan todas estas fotos se observa que en general existe una diferencia entre las imágenes correspondientes a las secuencias con y sin tratamiento enzimático. Las fibras correspondientes a secuencias con etapa X muestran en su superficie mayores escamas, grietas, estrías y hendiduras; son de aspecto más rugoso y heterogéneo. En la foto (b) de la Figura 11-3, correspondiente a la pasta XOAZP, se puede observar como una parte de la superficie de la fibra se está desprendiendo, dejando ver una superficie más rugosa. En la foto (c) de la misma secuencia, se observan zonas en la superficie de la fibra más lisas y otras más rugosas, donde parece ser que ha habido una descamación. En las fotos (a) de la pasta XOZP y (d) de la XOZRP de la misma figura, y las fotos (a) y (b) de la Figura 11-2 de la pasta XOAZRP, muestran claramente zonas de grietas y hendiduras, que no se observan en la pasta OAZ₁RP (foto c de la Figura 11-2). Por lo que se puede concluir que es el tratamiento enzimático el que realmente produce un cambio morfológico en la superficie de la fibra que es fácilmente detectable y visual mediante SEM.

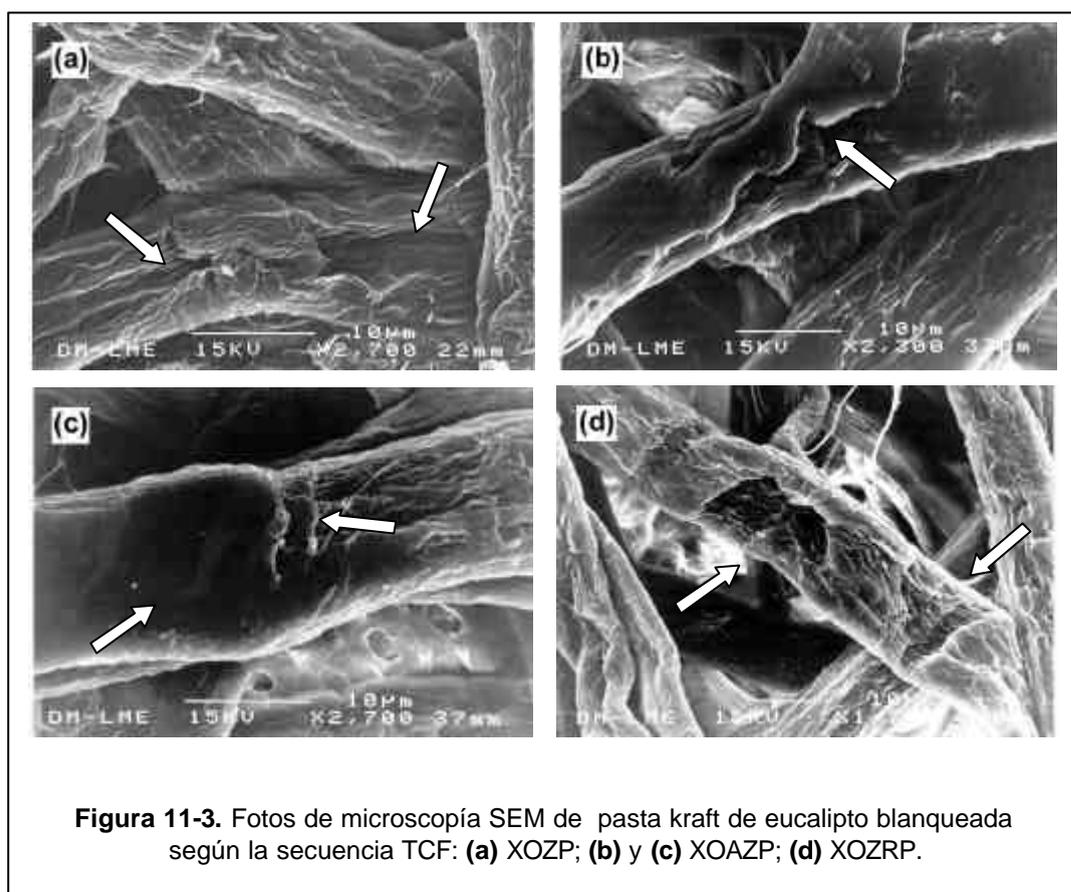


Figura 11-3. Fotos de microscopía SEM de pasta kraft de eucalipto blanqueada según la secuencia TCF: (a) XOZP; (b) y (c) XOAZP; (d) XOZRP.

Efecto del tratamiento enzimático en pastas ECF de eucalipto. Comparación pastas ECF y TCF.

En la Figura 11-4 se muestran fotos de las pastas ECF sin tratamiento enzimático (ODP), y con tratamiento (OXDP y XODP) donde la enzima que se utilizó fue la Pulpzyme HB, una xilanasa comercial. Como puede observarse en las fotos (a) y (b) correspondientes a las pastas ODP y OXDP, respectivamente, se aprecian muchos más filamentos y fibrillas, siendo más pronunciado en la segunda pasta. Sin embargo, en las fotos (c) y (d) de la pasta donde el tratamiento X está situado antes de la deslignificación con oxígeno (como en el caso de las pastas TCF) se observa una pasta más limpia, sin fibrilación ni filamentos entre fibras, con fibras muy parecidas a las pastas TCF anteriormente comentadas, donde incluso también se observan grietas y hendiduras (foto d) como aparecían en las TCF del apartado anterior. En el estudio de hidratos de carbono por HPLC (Capítulo 10) se obtiene que el pretratamiento enzimático siempre disminuye el contenido en xilosa, pero la situación del mismo también influye en esta reducción de xilosa, siendo más pronunciada cuando la etapa X está situada antes de la deslignificación con oxígeno.

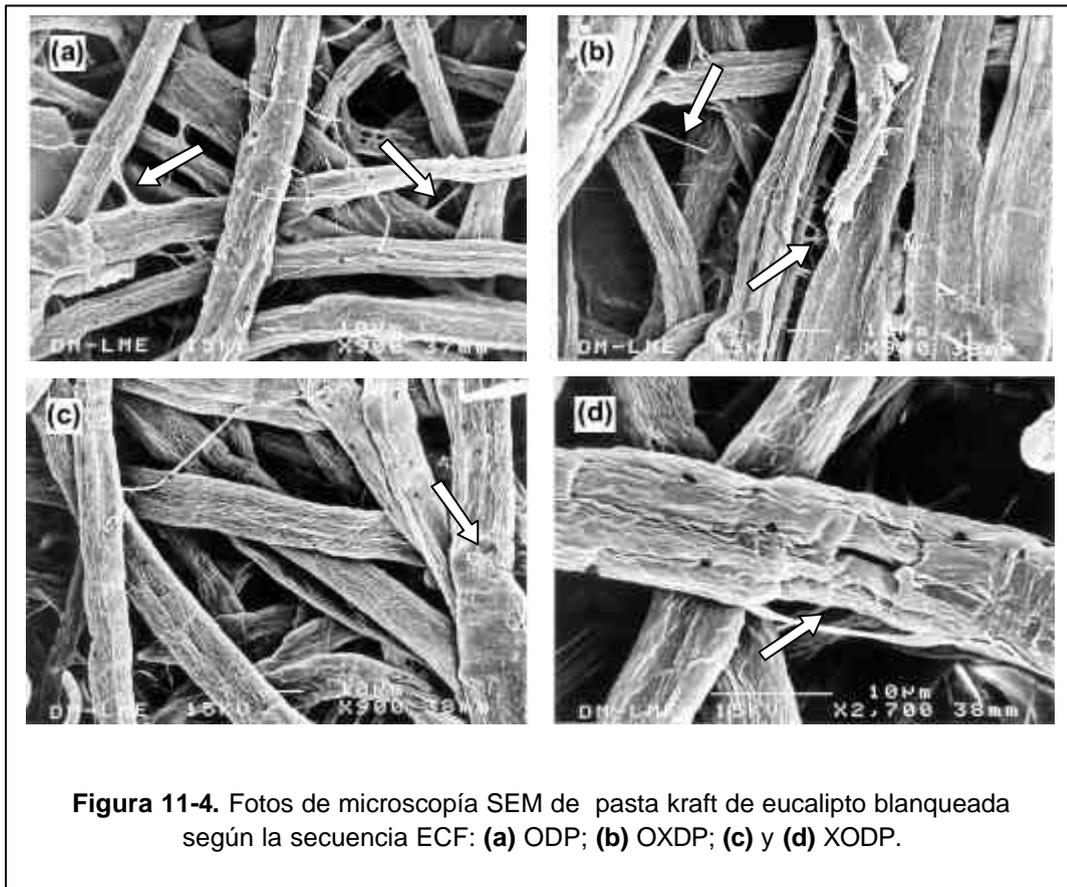
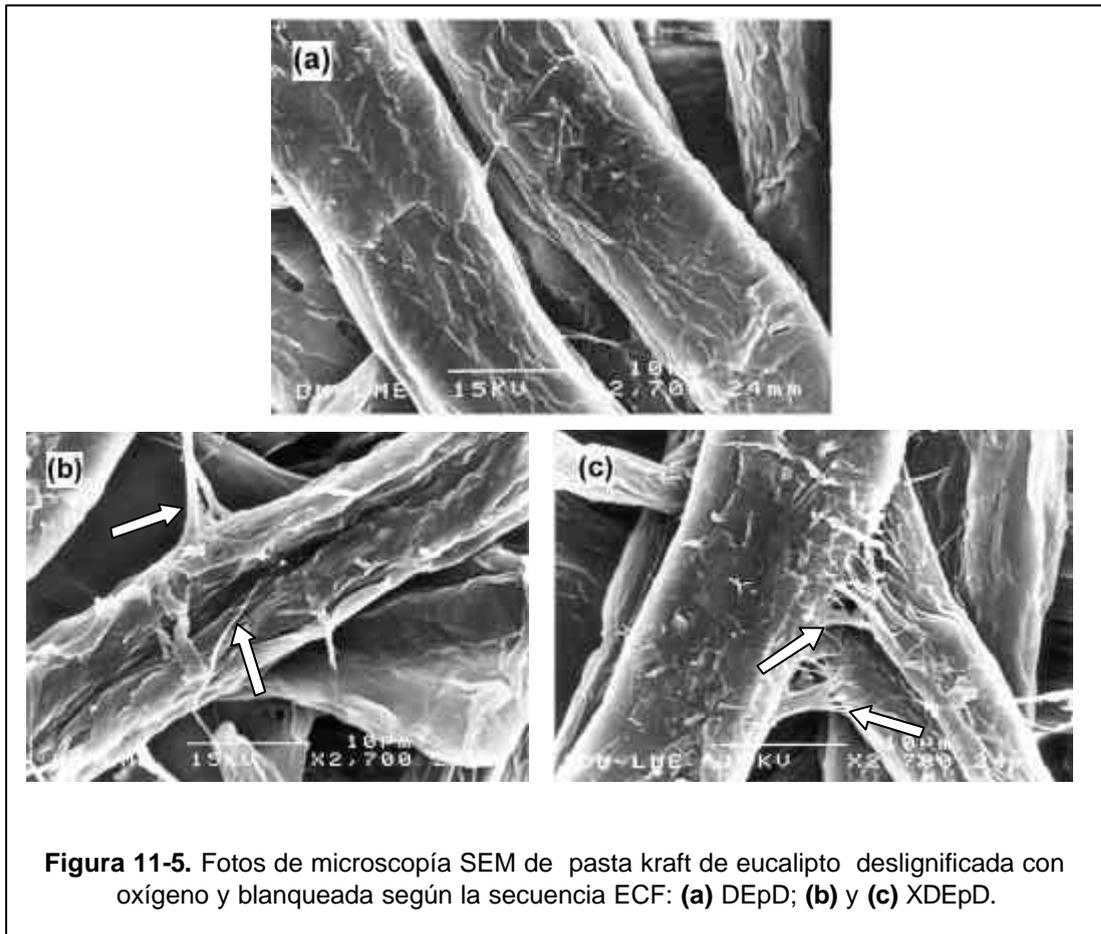


Figura 11-4. Fotos de microscopía SEM de pasta kraft de eucalipto blanqueada según la secuencia ECF: (a) ODP; (b) OXDP; (c) y (d) XODP.

Por tanto, por un lado se tiene que la situación del tratamiento enzimático puede tener un efecto diferente en la superficie de la fibra, dando lugar a mayor fibrilación cuando se sitúa después de la deslignificación con oxígeno. Y por otro lado, no existe una diferencia significativa en la superficie de la fibra entre pastas ECF y TCF, cuando el tratamiento enzimático se sitúa en el mismo lugar de la secuencia (antes de la etapa de deslignificación con oxígeno).

Otras fotos interesantes son las que se muestran en la Figura 11-5, que corresponden a una secuencia ECF en pasta deslignificada previamente, con y sin tratamiento enzimático (XDEpD y DEpD) con una xilanasa de laboratorio caracterizada por BLANCO *et al.* (1995). Al igual que ocurría con las TCF, la secuencia sin etapa X (DEpD, foto a) muestra fibras con una superficie más lisa y sin filamentos o fibrillas de unión entre fibras. Sin embargo, en la secuencia con etapa X (XDEpD, fotos b y c) se observan fibras con grietas o hendiduras, y mucha fibrilación o fibrillas de unión entre fibras quedando una pasta final mucho más fibrilada. Esta fibrilación exterior y que sirve como de unión entre fibras, no se observaba en la pastas TCF muy posiblemente debido a que la etapa X se realizaba antes de la etapa O,

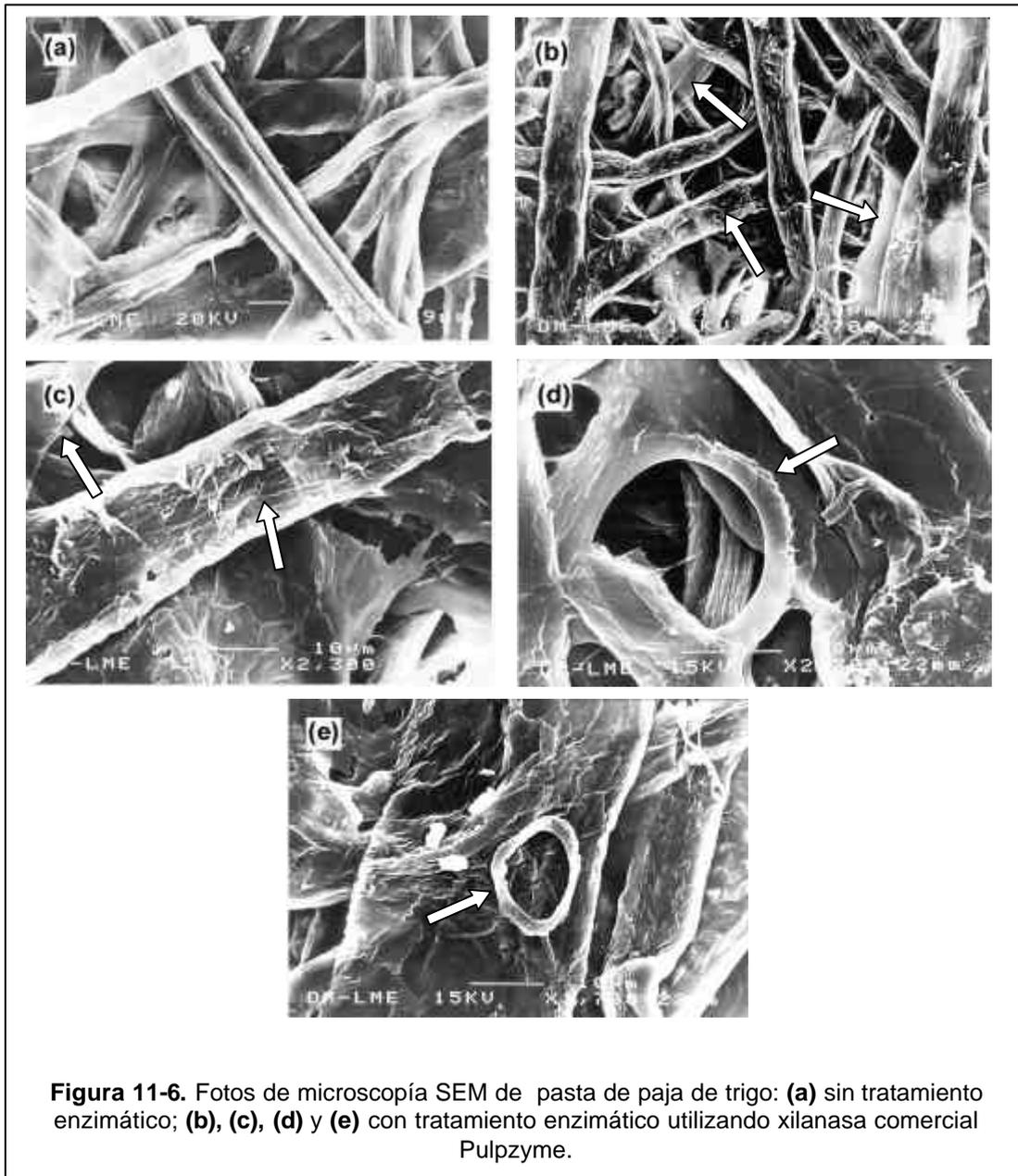
en cambio en estas pastas ECF es al revés, lo que concordaría con lo anteriormente expuesto.



Efecto del tratamiento enzimático en pasta de paja de trigo

En la Figura 11-6 se muestran fotos de pasta de paja sin tratar (foto a) y tratada (fotos b, c, d y e) con xilanasas Pulpzyme. Como puede observarse, las fibras de la pasta de paja sin tratar son muy lisas y limpias, no se observa fibrilación en la muestra pero sí fibras de diferentes grosores. En cambio, la foto (b) que presenta la misma pasta tratada con enzima, muestra unas fibras más rugosas y heterogéneas, presentando como filamentos pequeños en su superficie. Estos filamentos se ven con mayor detalle en la foto (c) de la misma muestra; la superficie parece “despellejada” o pelada. En el extremo de la foto se observa como un velo o film, muy característico en el análisis de este tipo de fibras, y que también se distingue en la foto anterior. Se trata de material orgánico, y podría ser la descomposición de material celulósico, que de alguna forma ha dado lugar a una especie de film sin ninguna orientación

o estructura determinada. Las fotos (d) y (e) muestran uno de los anillos de los vasos anillados, componentes característicos de este tipo de materia prima; durante el tratamiento enzimático parece que se hidrolizan fácilmente este tipo de componentes no celulósicos que no benefician el proceso de fabricación del papel lo que ya se comentó en el Capítulo 7.



En comparación con las fibras de eucalipto, se observa que las muestras de paja presentan mayores impurezas o componentes no celulósicos. Además, son mucho más lisas que las

de eucalipto, lo que explicaría alguna de las diferencias obtenidas en las propiedades físicas, como es la resistencia al desgarro.

Resumiendo, lo que sí se observa es un ataque superficial de la fibra por parte de la enzima, lo que de nuevo facilitará el flujo hacia el interior de las fibras, de los reactivos utilizados en los posteriores tratamientos de blanqueo.

Así pues, la microscopía electrónica de barrido permite ver los cambios superficiales en las fibras, los cuales son muy evidentes y visualizables, cuando éstas han sido tratadas con enzimas. Dependiendo del tipo de enzima, se produce uno u otro tipo de acción en la superficie, pero en el fondo se basa en “abrir” la fibra, es decir, en hacerla más accesible a los siguientes agentes de blanqueo. Algunas de las enzimas, incluso producen mayor fibrilación o la facilitan. En todo caso, las enzimas producen un cambio superficial en la fibra debido a la hidrólisis que efectúan, lo que coincide con la opinión de otros autores (BUSCHLE-DILLER *et al.*, 1994 (a) y (b); PHAM *et al.*, 1995; GARG *et al.*, 1998; BUSTAMANTE *et al.*, 1999).

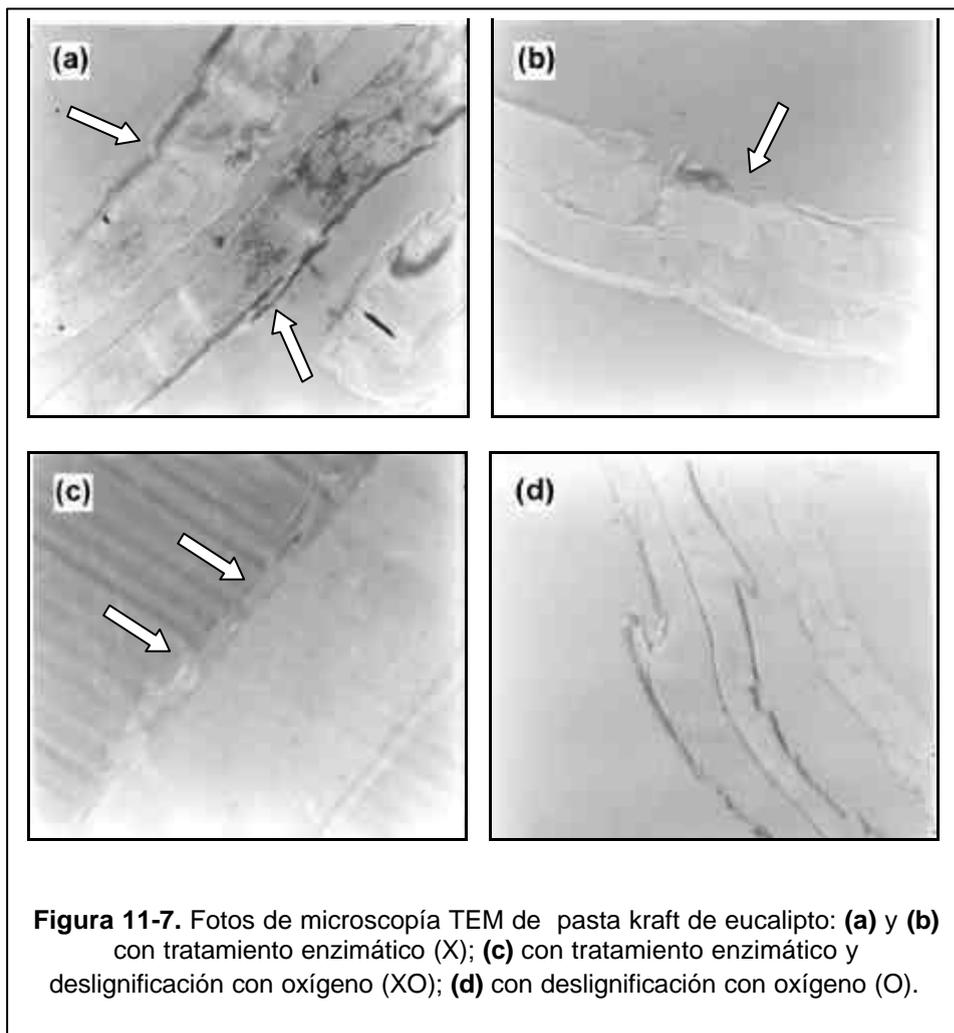
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las fotografías de SEM permiten ver la superficie de la fibra tal como la veríamos en la realidad con muchos aumentos, sin embargo, no permite distinguir si lo que se está viendo se trata de lignina o hidratos de carbono. En cambio, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite ver, por ejemplo, la distribución de la lignina. El problema de la microscopía TEM, a diferencia de la SEM, es la dificultad de su interpretación. Existen diferentes estudios de aplicación de la técnica TEM para el análisis de diferentes tratamientos en fibras para papel, como es el efecto de la aplicación de hongos (MARTÍNEZ *et al.*, 1990 y 1994; BARRASA *et al.*, 1992 y 1995) y de enzimas (HAYASHI *et al.*, 1995; SIGOILLOT *et al.*, 1997; GOODELL *et al.*, 1998), o bien la localización o distribución de la lignina en la fibra (ZHANG *et al.*, 1998) o estudios de cristalinidad (HEUX *et al.*, 1999). En el presente trabajo lo que se pretende es poder realizar una interpretación más profunda de los resultados obtenidos con SEM, ya sea por localización de la lignina, o bien destrucción o degradación de las paredes de la fibra.

Los primeros estudios realizados con TEM fueron con pasta de paja, pero la interpretación de las fotos obtenidas resultó ser de gran dificultad, probablemente debido a la gran variación de componentes presentes en este tipo de materia prima.

Las siguientes pastas analizadas fueron muestras de pasta kraft de eucalipto con tratamiento enzimático (X), deslignificación con oxígeno (O) y ambos tratamientos (XO). Algunas de las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 11-7. Como puede apreciarse, la interpretación es muy difícil. A nivel general, se observó que algunas muestras quedaban más contrastadas que otras. El tratamiento previo que se aplica a las muestras antes de su visualización por microscopio es el mismo, sin embargo, algunas presentaban un mejor

contraste que otras. Las más contrastadas correspondían a la muestra XO, seguida de la X y finalmente la O. El hecho de que una muestra quede más contrastada que otra, significa que la primera tiene mayor afinidad por la solución utilizada y por tanto la solución penetra con mayor facilidad. Esto indica que el tratamiento de blanqueo aplicado ha provocado una modificación en la estructura de la fibra, aumentando su accesibilidad. Por lo que se deduce que la muestra XO tiene una mayor afinidad o accesibilidad a la solución utilizada para contrastar, y por tanto, probablemente también tenga esta mayor accesibilidad para los posteriores reactivos utilizados para el blanqueo.



En la foto (a) de la Figura 11-7 correspondiente a la muestra X, parecen apreciarse algunas zonas de degradación de la pared primaria o S_1 . Estas zonas podrían corresponder a las hendiduras o surcos que se apreciaban en SEM. En la siguiente foto (b) de la misma muestra, se observa también una zona de pérdida de pared primaria o S_1 de la superficie de la fibra. Estos detalles no se apreciaron con tanta claridad en la muestra O (foto d). En la

foto (c) de la muestra XO, se observa uno de los lados de la pared primaria o S_1 muy deteriorada, permitiendo más fácilmente el acceso de posteriores reactivos de blanqueo. La foto (d) de la pasta O, muestra una fibra con una pared primaria o S_1 que mantiene más o menos una cierta continuidad, no mostrando surcos ni deterioros.

Sin embargo, cabe indicar que no se consiguió el éxito esperado con esta técnica, lo que se atribuye a que posiblemente para utilizar la microscopía de transmisión la muestra debe reunir ciertas condiciones, y una de ellas, y que después del estudio realizado consideramos que es la más importante, es que la muestra debe ser homogénea desde el punto de vista de colocación de las fibras. Las muestras que se han analizado se han tomado de una hoja de laboratorio donde las fibras no tienen orientación y están dispuestas al azar sin mantener una dirección fija. Entonces, como se realizan cortes muy finos de la muestra, no se puede asegurar si el corte de la fibra es netamente transversal o longitudinal, por lo que no se sabe con certeza como se está visualizando la fibra.

Los estudios sobre TEM que se han hallado en la bibliografía, toman muestras de la materia prima tal como se encuentra en el árbol o en el vegetal, donde las fibras están colocadas en una misma dirección, por lo que cuando se realiza el corte para visualizar la muestra por TEM, se sabe si éste es transversal o longitudinal, pudiendo así interpretar mejor los resultados.

CONCLUSIÓN

La microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) son dos técnicas que permiten el análisis microscópico de muestras de fibras para papel. Estos dos métodos se han utilizado para poder observar los cambios en la superficie de la fibra que tienen lugar como consecuencia de la aplicación de diferentes tratamientos de blanqueo.

Los estudios de SEM muestran claramente que la aplicación de la xilanasa provoca un cambio en la superficie de las fibras. Las fibras sin tratamiento enzimático muestran superficies más lisas, pulidas y uniformes. Sin embargo, en las fibras que han sufrido un tratamiento enzimático se aprecia una superficie más rugosa, estriada y con hendiduras, es decir, una superficie más abierta. Estos resultados corroboran el hecho de que las xilanasas actúan hidrolizando los xilanos depositados en la superficie de la fibra y que actúan como barrera física a la penetración de agentes de blanqueo. Al ser eliminados, el flujo de los agentes de blanqueo es más fácil, por lo que se justifica el efecto estimulador o potenciador de la xilanasa, tanto en fibras de eucalipto como de paja.

La localización de la enzima en la secuencia de blanqueo parece tener un efecto diferente en la actuación sobre la superficie de la fibra, pero no deja de ser un ataque a la misma para facilitar el acceso a los posteriores reactivos.

No existen diferencias claras entre las secuencias ECF y TCF estudiadas. Tampoco, se observa un claro efecto en la morfología de la fibra cuando se aplica el aditivo y/o el

postratamiento, aunque sí parece evidenciarse un efecto de “limpieza” o eliminación de fibrillas y escamas, lo que justificaría los valores de DQO obtenidos en los efluentes.

Por tanto, el tratamiento que realmente ejerce un efecto superficial fácilmente detectable por SEM es el tratamiento enzimático, cuyos efectos en la superficie de la fibra son más visibles en los primeros estadios de blanqueo.

En cuanto a TEM, la dificultad de esta técnica en comparación con SEM, radica en la interpretación de las imágenes obtenidas. En las muestras analizadas se han detectado algunas diferencias debidas a la aplicación de la enzima que pueden relacionarse con los resultados obtenidos mediante SEM. Sin embargo, no se consiguió el éxito esperado debido seguramente a la falta de orientación de las fibras en las muestras analizadas.

Los cambios morfológicos de las fibras pueden ser estudiados con mayor facilidad mediante SEM, o bien se debe hallar la forma de obtener muestras con las fibras orientadas en una dirección y perfectamente paralelas para poder profundizar mejor con la técnica de TEM.

REFERENCIAS

- AITKEN, Y.; CERANTOLA, G.; SERRE, J. (1990). Microscopie à balayage. *Revue A.T.I.P.*, 44 (8/9): 312-316.
- AXEGARD, P. (1987). Particles difficult to bleach in softwood kraft pulp. *Svensk Papperstidning*, 81 (14): 449.
- BARRASA, J.M.; CAMARERO, S.; MARTÍNEZ, A.T.; RUEL, K. (1995). Ultrastructural aspects of wheat straw degradation by *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 766-770.
- BARRASA, J.M.; GONZÁLEZ, A.E.; MARTÍNEZ, A.T. (1992). Ultrastructural aspects of fungal delignification of Chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysocrea*. *Holzforschung*, 46(1): 1-8.
- BLANCO, A.; VIDAL, T.; COLOM, J.F.; PASTOR, F.I.J. (1995). Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12): 4468-4470.
- BLANCO, A.; DÍAZ, P.; MARTÍNEZ, J.; VIDAL, T.; TORRES, A.L.; PASTOR, F.I.J. (1998). Cloning of a new endoglucanase gene from *Bacillus* sp. BP-23 and characterisation of the enzyme. Performance in paper manufacture from cereal straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 48-54.
- BUSCHLE-DILLER, G.; ZERONIAN, S.H. (1994(a)). Enzymatic and acid hydrolysis of cotton cellulose after slack and tension mercerization. *Textile Chemist and Colorist*, 26 (4): 17-24.

- BUSCHLE-DILLER, G.; ZERONIAN, S.H.; PAN, N.; YOON, M.Y. (1994(b)). Enzymatic hydrolysis of cotton, linen, ramie, and viscose rayon fabrics. *Textile Research Journal*, 64 (5): 270-279.
- BUSTAMANTE, P.; RAMOS, J.; ZÚÑIGA, V.; SABHARWAL, H.S.; YOUNG, R.A. (1999). Biomechanical pulping of bagasse with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Pleurotus ostreatus*. *Tappi Journal*, 82 (6): 123-128.
- CETNAR, B.W.; HEITUR, I.H. (1975). Case histories in solving coating problems with the electron microscope. *Tappi Journal*, 58 (9): 91.
- DUCHESNE, I.; DANIEL, G. (1999). The ultrastructure of wood fiber surfaces as shown by a variety of microscopic methods – a review. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 14 (2): 129-139.
- ELDRED, N.R.; HALLER, M.N. (1977). SEM of coated papers. *Tappi Journal*, 60 (62): 84.
- GARCÍA, O. (1998). Influencia de la aplicación de celulasas en la fabricación de papel a partir de fibras de eucalipto. Proyecto Final de Carrera, Departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Universidad Politécnica de Cataluña.
- GARDNER, D.J.; GENCO, J.M.; JAGEKLS, R.; SIMAR, G.L. (1982). SEM-EDAX technique for measuring lignin distribution in pulp fibers. *Tappi Journal*, 65 (9): 123.
- GARG, A.P.; ROBERTS, J.C.; MCCARTHY, A.J. (1998). Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces Thermoviolaceus* and its comparison with 2 commercial enzyme preparations on birch wood kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 22 (7): 594-598.
- GOODSELL, B.; YAMAMOTO, K.; JELLISON, J.; NAKAMURA, M.; FUJII, T.; TAKABE, K.; HAYASHI, N. (1998). Laccase immunolabeling and microanalytical analysis of wood degraded by *Lentinus Edodes*. *Holzforschung*, 52 (4): 345-350.
- HAYASHI, N.; ISHIHARA, M.; SHIMIZU, K. (1995). The features in enzymatic hydrolysis residues of highly crystalline native cellulose. *Mokuzai Gakkaishi*, 41 (12): 1132-1138.
- HEUX, L.; DINAND, E.; VIGNON, M.R. (1999). Structural aspects in ultrathin cellulose microfibrils followed by C-13 CP-MAS NMR. *Carbohydrate Polymers*, 40 (2): 115-124.
- KUNDU, S.K.; RAY, P.K.; SEN, S.K.; BHADURI, S.K. (1993). Characterization of grafted jute fiber by optical and scanning electron microscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 49 (1): 25-30.
- MARTÍNEZ, A.T.; BARRASA, J.M.; ALMENDROS, G.; GONZÁLEZ, A.E. (1990). Fungal transformation of lignocellulosics as revealed by chemical and ultrastructural analyses. En: Coughlam, M.P. y Amaral-Collaco, M.T. (eds). *Advances in Biological Treatment of Lignocellulosic Materials*. London: Elsevier Appl. Sci., p. 129-147.
- MARTÍNEZ, A.T.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; GUTIÉRREZ, A.; MUÑOZ, C.; VARELA, E.;

- MARTÍNEZ, M.J.; BARRASA, J.M.; RUEL, K.; PELAYO, J.M. (1994). Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 265-274.
- ORMEROD, D.L.; SIMON, G.C.; GIBBON, D.L. (1988). Paper mill additive and contaminant distribution mapping using SEM-EDAX. *Tappi Journal*, 71 (4): 211.
- PETTERSSON, I.; RIGDAHL, M.; FINEMAN, I.; ENGSTROM, G. (1987). The composition of mineral particles removed during determination of wet surface strength of coated papers. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 2 (4): 120.
- PHAM, P.L.; ALRIC, I.; DELMAS, M. (1995). Incorporation of xylanase in total chlorine free bleach sequences using ozone and hydrogen peroxide. *Appita Journal*, 48(3): 213-217.
- RICHTER, V., ORLANDINI, S., CAOBIANCO, S., SCOGNAMIGLIO, C., LOPOPOLO, S., GROSSI, B., CAPRETTI, G.; FOCHER, B. (1996). Non-wood plant pulps. Morphology and papermaking properties. *Fourth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*. Stresa, Italy, p. 366-373.
- SABHARWAL, H.S.; AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R.A.; YOUNG, R. (1994). Biomechanical pulping of kenaf. *Tappi Journal*, 77(12): 105-112.
- SACHS, I.B.; LEATHAM, G.F.; MYERS, G.C.; WEGNER, T.H. (1990). Distinguishing characteristics of biomechanical pulp. *Tappi Journal*, 73 (9): 249-254.
- SAKA, S.; THOMAS, R.J.; GRATZL, J.S. (1978). Lignin distribution-determination by SEM-EDAX. *Tappi Journal*, 61 (1): 73.
- SIGOILLOT, J.C.; PETITCONIL, M.; RUEL, K.; MOUKHA, S.; COMTAT, J.; LAUGERO, C.; JOSELEAU, J.P.; DE CHOUDENS, C.; ASTHER, M. (1997). Enzymatic treatment with manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing wheat straw pulp characteristics. *Holzforchung*, 51 (6): 549
- UHLIN, K.I.; ATALLA, R.H.; THOMPSON, N.S. (1995). Influence of Hemicelluloses on the Aggregation Patterns of Bacterial Cellulose". *Cellulose*, 2 (2): 129 – 144.
- VOILLOT, C. (1982). M.E.B. dans le domaine papetier (2ème partie). *ATIP*, 36 (6-7): 297.
- VOILLOT, C. (1983). Application quantitative du M.E.B. Mesure des effets de surface du calandrage. *ATIP*, 37 (10): 605.
- WALBAUM, H.H. (1972). Pigment dispersion property evaluation by SEM. *Tappi*, 55 (7): 1108 – 1114.
- WALBAUM, H.H.; ZAK, H. (1976). Internal structure of paper and coatings in SEM cross sections. *Tappi Journal*, 59 (3): 102.
- WILLIAMS, G.J.; DRUMMOND, J.G. (2000). Preparation of large sections for the microscopical

study of paper structure. *Journal of Pulp and Paper Science*, 26 (5): 188-193.

ZHANG, X.Z.; KANG, G.J.; N, Y.; VANHEININGEN, A.R.P.; MSLANKAR, A.; DARABIE, A.; REEVE, D. (1998). Initial delignification and cellulose degradation of conventional and ethanol assisted ozonation. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 18 (2): 129-157.