

CAPÍTULO 3

MÉTODOS GENERALES



En este capítulo se detallan sólo aquellos métodos utilizados en común en los distintos capítulos de la Tesis.

3.1. DETERMINACIONES SOBRE LA PULPA

3.1.1. Lavado de las pulpas

3.1.1.1. Intercambio de la pulpa a su forma ácida

Para remover los iones metálicos y para que todos los grupos ácidos se encuentren de la misma manera (en su forma ácida), la pulpa se lavó dos veces consecutivas con HCl pH=2,0 durante 45 min al 4% de consistencia y luego con agua destilada hasta pH 4,5-5,0 (similar a la metodología empleada por Fors 2000: duración de los lavados de 30 min). Finalmente la pulpa se espesó por centrifugación, se dispersó y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Cuando se trabajó con pulpa con finos, entre los lavados se filtró por un Büchner conteniendo un tejido textil y recirculando el filtrado por la mata de fibras para retener los finos.

3.1.1.2. Intercambio de la pulpa a su forma sodio

Partiendo de la pulpa en su forma ácida, se colocó en agua destilada al 2 % de consistencia, se neutralizó la suspensión con solución diluida de NaOH (1 g/L) y se dejó bajo esas condiciones durante 10 min. En ese tiempo el pH disminuye debido a que se produce el intercambio de iones Na^+ por iones H^+ de los grupos ácidos carboxílicos presentes en la pulpa. Se ajustó nuevamente el pH con NaOH y se dejó otros 10 min. Se filtró la pulpa en bolsa de tela y luego se espesó por centrifugación.

Cuando se trabajó con pulpa con finos, se recirculó el filtrado por la mata de fibras para retener los finos.

3.1.1.3. Intercambio de la pulpa a su forma calcio

Partiendo de la pulpa en su forma sodio sin filtrar y estimando que la cantidad de grupos ácidos presentes en la pulpa es aproximadamente 80 $\mu\text{eq/g}$ pulpa seca, se agregó CaCl_2 5 g/L en un 50% en exceso respecto a la cantidad estequiométrica y se dejó bajo esas condiciones durante

10 min. Finalmente se ajustó el pH a 7,0 con una solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1,8 g/L filtrada en papel de filtro y se dejó en esas condiciones durante 15 min. Las condiciones finales de la suspensión fueron: Conductividad 250-270 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y pH 7,0. Finalmente se centrifugó en bolsa de tela.

Cuando se trabajó con pulpa con finos, se recirculó el filtrado por la mata de fibras para retener los finos.

3.1.2. Grupos ácidos totales por titulación conductimétrica

Los grupos ácidos totales se determinaron a través de la titulación conductimétrica propuesta por Lloyd y Horne (1993). Sobre la base de la técnica desarrollada inicialmente por Katz y col. (1984), estos autores propusieron la sustitución del titulante NaOH por NaHCO_3 .

Se pesaron aproximadamente 3g de pulpa seca y se le realizó un lavado ácido de acuerdo a la metodología explicada en la sección 3.1.1 de este capítulo. De esta manera los grupos ácidos pasan a su forma ácida. Luego se lavó la pulpa con agua destilada hasta que la conductividad en la solución fue menor a 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Se colocó la pulpa en un vaso cerrado (**Figura 3.1**) conteniendo 450 mL de NaCl 10^{-3}N . La conductividad inicial de 110 $\mu\text{S}/\text{cm}$ aumentó en ese momento debido a que se produce un intercambio entre los iones sodio de la solución y una fracción de los protones presentes en los ácidos carboxílicos de la pulpa (**Figura 3.2**). Como la conductividad de los protones es mayor que la de los iones sodio, la conductividad de la suspensión aumenta. Luego, bajo continuo mezclado por agitación magnética y paso de nitrógeno, se tituló con NaHCO_3 0,1N. Cada 5 min, se agregaron desde la microbureta 0,2 mL de titulante. Se detuvo la agitación antes de agregar los siguientes 0,2 mL de titulante y se midió la conductividad (ajustada automáticamente por temperatura) utilizando un termo/conductímetro ALTRONIX CTX-1.

Finalizada la titulación, se filtró la pulpa en filtro de vidrio poroso N°2 y se lavó dentro del mismo filtro con agua destilada hasta conductividad en el filtrado menor a 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se determinó finalmente el peso seco de la pulpa.

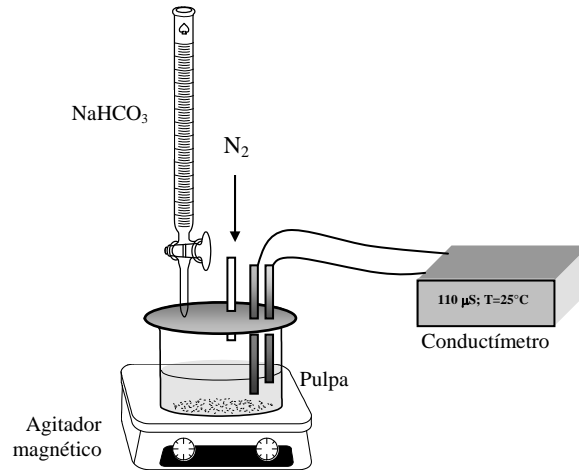


Figura 3.1. Dispositivo utilizado para llevar a cabo la titulación conductimétrica. La pulpa se agita continuamente y se agrega cada 5 min 0,2 mL del titulante previa lectura de la conductividad.

La **Figura 3.2** muestra una curva de titulación típica. El punto de intersección entre las líneas A y B corresponde a los mL de titulante utilizados para neutralizar los grupos carboxílicos de la pulpa.

El uso de NaHCO_3 en reemplazo del NaOH evita la cuantificación errónea de los grupos fenólicos de la lignina como grupos ácidos (Lloyd y Horne 1993). Cuando se utiliza NaOH como titulante, cerca del punto de equivalencia la solución alcanza un pH cercano a 11,0. A ese pH los grupos fenólicos de la lignina se ionizan parcialmente y por lo tanto son cuantificados erróneamente como grupos ácidos.

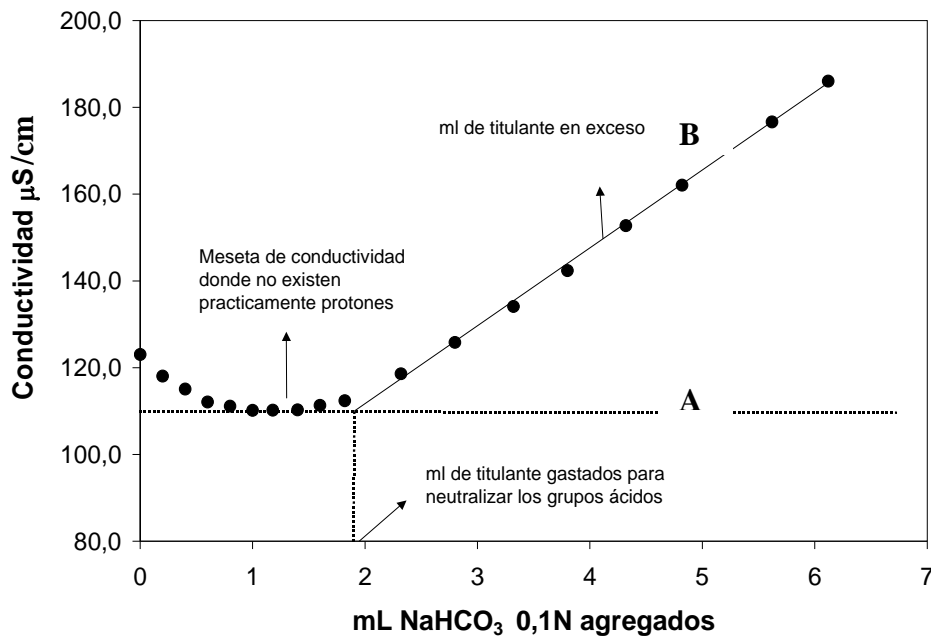


Figura 3.2. Curva de titulación conductimétrica típica de pulpas *kraft*. La intersección de las líneas A y B corresponde a los mL de titulante utilizados para neutralizar los grupos ácidos carboxílicos

3.1.3. Grupos ácidos superficiales por adsorción polielectrolítica

Para esta determinación se utilizó el método de adsorción de polielectrolitos puesto a punto en el Capítulo 4. En forma breve: Muestras de 0,5 g de pulpa, llevadas previamente a su forma sodio se agregaron a soluciones del polielectrolito catiónico (cloruro de polidimetildialilamonio, pDMDAAC de masa molecular mayor de $M_w: 10^5$) a distintas concentraciones, en NaCl 0,01 N. Las mezclas fueron agitadas magnéticamente durante 30 min a 25 °C para alcanzar el equilibrio de adsorción. Luego se determinó en el filtrado la concentración del polielectrolito no adsorbido mediante la titulación coloidal usando polivinil sulfato de potasio (PVSK) y o-toluidina como indicador. El contenido de grupos ácidos superficiales se determinó a partir de gráficas de isotermas de adsorción (cantidad adsorbida *versus* cantidad de pDMDAAC en equilibrio en la solución) ajustadas con la ecuación 4.20 propuesta en el Capítulo 4.

3.1.4. Extractivos

De acuerdo a las Normas Tappi T204 cm-97 y Tappi 264 cm-97, se determinó la cantidad de material no volátil soluble presente en la siguiente secuencia de solventes: 1) éter, 2) diclorometano, 3) etanol 95%: tolueno (1:2 v/v), 4) etanol 95% y 5) agua destilada en ebullición.

Se ha probado que la mezcla etanol/tolueno extrae el mismo tipo de material que la mezcla etanol/benceno (Tappi T264 cm-97).

Las extracciones se realizaron en extractor Soxhlet sobre 2,0 g de pulpa y durante 4h, excepto con el agua destilada que se dejó en reflujo durante una hora solamente para evitar degradación de carbohidratos. Finalizadas las extracciones se evaporó el solvente en un rotavapor bajo vacío a 45°C, se secó en estufa a 100-105°C y se pesó el residuo seco. Se calculó el porcentaje de cada fracción en relación a la masa original de pulpa seca. La suma de todas estas fracciones corresponde al contenido de extractivos totales.

Para la determinación de holocelulosa, lignina Klason; lignina soluble y para la aislación de la lignina se utilizó esta pulpa libre de extractivos.

3.1.5. Holocelulosa

Se determinó el contenido de holocelulosa utilizando el método propuesto por Guerra (2002). Se colocó en un baño termostatzado a 75°C y bajo continua agitación, un Erlenmeyer conteniendo 2 g de pulpa libre de extractivos y 64 mL de agua destilada. Cada media hora se agregaron 0,2 mL ácido acético glacial y 0,6 mL de clorito de sodio 40% (p/v). Esta operación se repitió cuatro veces (total: 2 h). A pesar de que el clorito de sodio es poco reactivo, *in situ* se forman compuestos más agresivos como ácido hipocloroso y dióxido de cloro (Vuorinen y Alén 1999).

Luego la holocelulosa resultante se filtró, se lavó con agua, luego con acetona y finalmente se secó en estufa a 50°C. Se determinó el peso seco de la holocelulosa y se determinó su contenido en relación a la masa de pulpa original. Una fracción de esta holocelulosa se utilizó para determinar el contenido de lignina residual utilizando el método de lignina Klason.

El contenido de holocelulosa se corrigió por extractivos y por lignina residual para expresar el contenido de holocelulosa como porcentaje de holocelulosa en la pulpa original.

3.1.6. Lignina Klason y lignina soluble.

Se aplicó el método de lignina Klason propuesto por Gomide y Demuner (1986), el cual es más sencillo y más rápido que el método Klason tradicional (Norma Tappi 222-om 02). A 300 mg de pulpa libre de extractivos se le agregó 3 mL de ácido sulfúrico al 72% (p/p) para hidrolizar los carbohidratos. Para ello, se colocó en un baño termostático a 20°C durante 1h y se agitó continuamente. Luego se diluyó, reduciendo la concentración de ácido sulfúrico hasta 3 % (p/p). Esta solución se colocó en autoclave a 118°C durante 1h en un recipiente cerrado no herméticamente. El residuo sólido se filtró en filtro de vidrio N° 2 de peso conocido y se secó en estufa hasta pesada constante. En el filtrado quedó la lignina soluble y los azúcares.

Para determinar el contenido de lignina soluble, se utilizó la técnica TAPPI Useful Method UM-250 (1985) citada y descrita por Dence (1992). El filtrado anterior, conteniendo la lignina soluble en medio ácido, se pasó por un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y se midió la absorbancia de la solución a 205 nm, tomando como blanco una solución de 3% (p/p) de H₂SO₄. Luego, considerando la absorptividad de la lignina de 110 L g⁻¹ cm⁻¹ se determinó el contenido de lignina soluble.

En el filtrado como productos de degradación de los carbohidratos se encuentra presente furfural y el hidroximetilfurfural que absorben fuertemente a 280 nm. Sin embargo, a 205 nm esta interferencia es despreciable (Dence 1992).

La lignina insoluble y soluble se corrigieron por extractivos para expresar estos contenidos como porcentajes de lignina en la pulpa original.

3.1.7. Aislación y caracterización de la lignina.

La aislación de lignina se realizó sobre la pulpa libre de extractivos. Las muestras de pulpa se colocaron en un extractor Soxhlet y la lignina se extrajo durante 6 h utilizando una solución 9:1

de dioxano:HCl 2 M. Luego se removió el solvente en un rotavapor, se suspendió la lignina en agua y se neutralizó la solución con bicarbonato de sodio. La lignina aislada fue filtrada, nuevamente suspendida en agua y liofilizada. Se determinó el rendimiento de este proceso de aislación.

3.1.7.1. Grupos hidroxilos fenólicos

El porcentaje de hidroxilos fenólicos se determinó utilizando dos métodos: 1) el método de Wexler (1964) (utilizado recientemente por Guerra 2002), 2) el método de Goldschmid (1954). En ambos métodos, la determinación de los hidroxilos fenólicos se realizó sobre la base de las absorptividades medias de compuestos modelos de lignina.

Método Wexler

El espectro UV diferencial se obtuvo de sustraer el espectro de la lignina en medio alcalino respecto de su espectro en medio ácido. Para la obtención del espectro en medio básico se preparó una solución de lignina (0,5 mg /mL de dioxano 96%) y se ajustó el pH a 13 con NaOH 1,0 N. Para la obtención del espectro en medio ácido se preparó una solución de lignina a la misma concentración pero a pH 1,0 utilizando HCl 1,0 N.

El $\Delta 250$ se obtuvo de trazar una línea recta desde el máximo de absorbancia a 250 nm hasta la línea de base. La línea de base se obtuvo de trazar una recta entre los valles a 229 nm y a 278 nm aproximadamente como se muestra en la **Figura 3.3**.

El porcentaje de hidroxilos fenólicos se obtuvo utilizando la ecuación (3.1):

$$\% [OH_{\text{fenólicos}}] = \frac{\Delta 250 \cdot 0,192}{C} \quad (3.1)$$

donde,

$\Delta 250$ = Absorbancia de la solución alcalina luego de sustraer la absorbancia de la solución ácida tomando como línea de base la línea recta entre los valles a 229 y a 278 nm.

C = concentración de la lignina en g/L.

0,192 = relación entre el porcentaje de hidroxilos fenólicos y las absorptividades de compuestos modelos a alrededor de 250 nm (Wexler 1964).

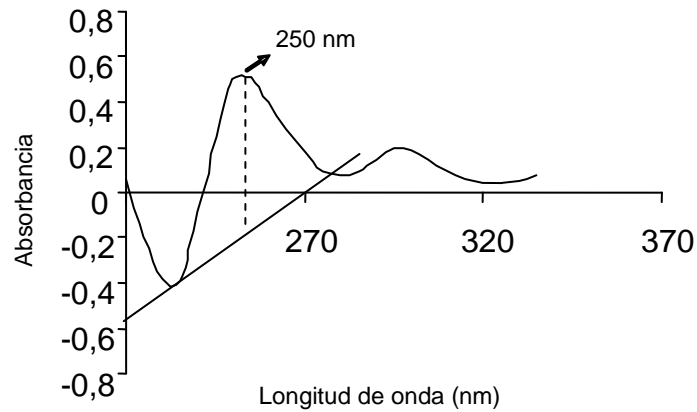


Figura 3.3. Ejemplo de un espectro UV diferencial de ligninas aisladas de *P. taeda* (extraído de Guerra 2002)

Método Goldschmid

El contenido de hidroxilos fenólicos se determinó a partir del mismo espectro UV diferencial obtenido utilizando el método Wexler, excepto que se midió la absorbancia a 300 nm (**Figura 3.4**) y se utilizó la ecuación 3.2.

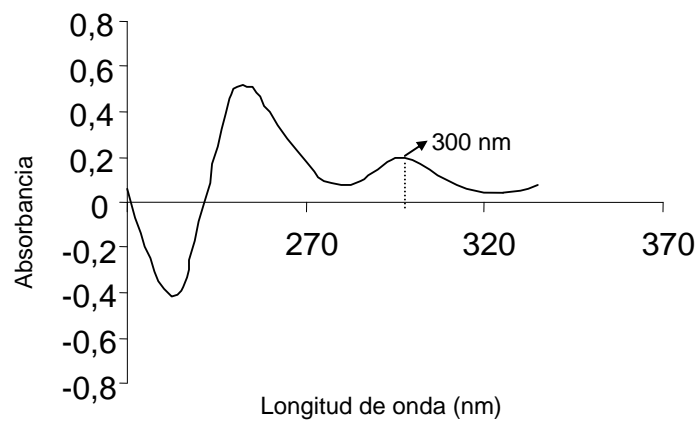


Figura 3.4. Ejemplo de un espectro UV diferencial de ligninas aisladas de *P. taeda* (extraído de Guerra 2002) donde se muestra cómo se determinó el contenido de hidroxilos fenólicos midiendo a 300 nm

La ecuación (3.2) es la siguiente:

$$\% [OH_{\text{fenólicos}}] = \frac{\Delta 300 \cdot 0,414}{C} \quad (3.2)$$

donde,

$\Delta 300$ = Absorbancia de la solución alcalina luego de sustraer la absorbancia de la solución ácida a 300 nm.

C = concentración de la lignina en g/L.

0,414 = relación entre el porcentaje de hidroxilos fenólicos y la absorbancias de compuestos modelos a alrededor de 300 nm (Goldshmid 1954)

3.1.7.2. Grupos ácidos en la lignina

El contenido de grupos ácidos en la lignina aislada se determinó utilizando el método propuesto por Zakis (1994).

A 40-60 mg de la lignina aislada se le agregaron 5 mL de LiOH 0,1 N valorado y en exceso y 2 mL de etanol 96 %, ambos medidos con micropipeta. Se agitó y se colocó en un baño a 85°C durante 3 min.

Luego se agregó 1 mL de BaCl₂ 10% y se dejó enfriar 15 min (se produce un intercambio de los iones litio por los iones bario). Las sales de Ba-lignina precipitan.

La disminución de la concentración de iones hidroxilos del LiOH es equivalente al número de grupos ácidos que se determinan por titulación. La suspensión obtenida se diluye con agua destilada a un volumen total de 25 mL, se agita y centrifuga 2-3 min.

Con volpipeta se toman 20 mL del sobrenadante y se agregan 5 mL de HCl 0,1 N y gotas de indicador rojo de metilo. El exceso de ácido se titula con LiOH 0,1 N y el porcentaje de grupos ácidos se determina usando la ecuación (3.3) propuesta por Zakis, 1994.

$$COOH \% = \frac{(b - a) \times N \times 212.5}{W} \quad (3.3)$$

donde,

a : mL de LiOH utilizados para titular la muestra

b : mL de LiOH utilizados para titular el blanco

N : la normalidad de la solución de LiOH

W : peso de la muestra seca de lignina, mg

3.1.7.3. Grupos carbonilos

Se determinaron según Zakis (1994). En un tubo se colocan 80 mg de lignina aislada, 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 5 mL de una mezcla de 0,2 M de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 0,08 M de trietanolamina para producir una reacción de oximación (**Figura 3.5**). Cuando reacciona la $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ con los grupos carbonilos, se libera una cantidad de HCl equivalente a los grupos carbonilos que reacciona con la trietanolamina.

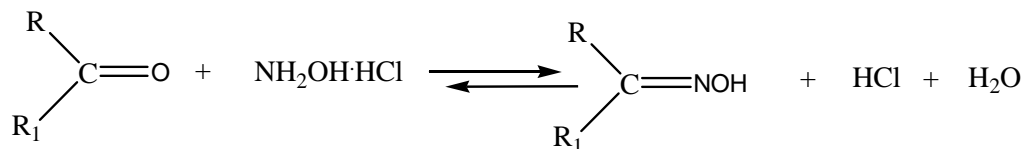


Figura 3.5. Reacción de oximación.

Los tubos se colocaron en un baño a 80°C por 2 h, y luego se trasvasó cuantitativamente a un Erlenmeyer con ayuda de un mínimo de agua destilada. Luego, el exceso de trietanolamina se tituló con HCl 0,1M hasta pH 3,3 y la cantidad de grupos carbonilos se determinó utilizando la ecuación (3.4).

$$\% = \frac{(b - a) \times N \times 280.1}{W} \quad (3.4)$$

donde,

a = mL de HCl utilizados para titular la muestra

b = mL de HCl utilizados para titular el blanco

N = Normalidad del HCl

W = masa seca de lignina, en mg

3.1.8. Cenizas

Para esta determinación se utilizó la Norma Tappi T211 om-02. Una cantidad conocida de pulpa se colocó en un crisol previamente tarado y se calcinó en mufla a 525°C por un período de una hora. Con otra fracción de la pulpa se determinó el contenido de humedad.

3.1.9. Valor de retención de agua porcentual. Forma calcio

El hinchamiento de las fibras se determinó por el WRV (*water retention value*) porcentual. Esta propiedad es la capacidad de retención de agua de la pulpa luego de ser sometida a centrifugación durante un período de tiempo establecido.

Según la ecuación (3.5) se define como:

$$\text{WRV \%} = \frac{(\text{g pulpa centrifugada} - \text{g pulpa seca})}{\text{g pulpa seca}} \cdot 100 = \frac{\text{g agua retenida}}{100 \text{ g pulpa seca}} \quad (3.5)$$

Debido a que el hinchamiento de la pulpa es dependiente de su forma iónica y de la fuerza iónica del medio, la determinación del WRV se realizó con los grupos ácidos siempre en su forma calcio, es decir, con el ion calcio como contraión, y en un medio neutro de CaCl_2 10^{-3} N.

3.1.9.1. WRV de la fracción fibrosa

Se partió de la pulpa (fracción R_{30} de la clasificación *Bauer McNett*) en su forma ácida y se realizó el pasaje a la forma calcio como se explica en la sección 3.1.1. de este capítulo.

Una vez obtenida la suspensión en su forma calcio a pH 7,0 y 2% de consistencia de pulpa se dividió en tres fracciones iguales por pesada de la suspensión en balanza de 0,01 g.

Cada una de estas fracciones se filtró por los dispositivos de WRV (**Figura 3.6**) diseñados según Zanuttini y col. (1996). Éstos contienen un disco de filtro de vidrio N°2 (frita).

Luego, se centrifugaron durante 30 min a 1750 g. Finalmente se pesó la pulpa centrifugada (peso húmedo) y la pulpa luego de secada en estufa a $105^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 h.

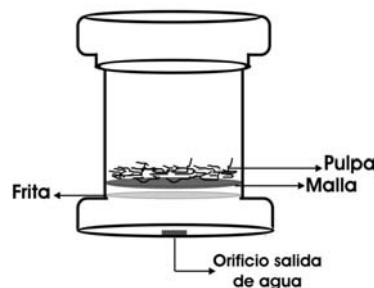


Figura 3.6. Dispositivo utilizado para determinar WRV. El agua libre presente en la pulpa se desplaza por centrifugación a través del orificio de salida inferior.

3.1.9.2. WRV de la pulpa completa

Para la determinación del valor de retención de agua de una pulpa con finos, se procedió de la misma manera, excepto que se recirculó el filtrado para que los finos queden retenidos en la mata de fibras formada sobre el filtro.

3.1.10. Clasificación por longitud de fibra

Se aplicó la Técnica SCAN M6:69 utilizando el equipo *Bauer McNett*. El tiempo de clasificación fue de 15 min. Se utilizaron las mallas estándares americanas 30; 50; 100 y 200.

3.1.11. Drenabilidad.

La drenabilidad se determinó utilizando la Técnica SCAN C21:65. Este ensayo da una medida de la velocidad con que drena una suspensión diluida de pulpa al 0,3% de consistencia. Se informa como mL CSF (*Canadian Standard Freeness*).

3.2. FORMACIÓN DE LAS HOJAS DE LABORATORIO EN FORMA CALCIO.

Para la formación de las hojas de laboratorio, se aseguró que la pulpa se encuentre en su forma calcio. Esto se debe a que en el Instituto de Tecnología Celulósica el agua utilizada para la formación de las hojas de laboratorio es agua de canilla filtrada en filtro de 25 μm , la cual contiene principalmente iones calcio y sodio. Se determinaron las características en promedio de esta agua y se muestran en la **Tabla 3.1**.

Si la pulpa se acondicionara a su forma sodio, los iones calcio presentes en el agua podrían desplazar los iones sodio, modificando las condiciones en que se encuentra la pulpa y consecuentemente las propiedades finales del papel.

Scallan y Grignon (1979) encontraron que los iones que más prevalecen en las pulpas químicas son los iones calcio y magnesio y concluyeron que es posible que los iones monovalentes sean desplazados durante el lavado de las pulpas por los iones divalentes presentes en el agua de canilla.

Tabla 3.1. Características generales del agua utilizada para la formación de las hojas de ensayo.

Conductividad	165 - 225 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Valor de pH	8,0 – 8,5
Contenido de Na^{a}	15-17 ppm
Contenido de Ca^{a}	13-15 ppm
Contenido de Fe	Menor a 0,1 ppm

^a Determinado por absorción atómica.

La técnica estándar Tappi para formación de hojas especifica el uso de agua deionizada la cual no garantiza la permanencia de la pulpa en su forma calcio ya que esta agua presenta normalmente un pH 5,5-6,0. La técnica SCAN no especifica el tipo de agua a utilizar.

Haynes (1998) para la formación de las hojas de laboratorio utilizó agua deionizada a pH 6,0. Propuso que a ese pH algunos grupos carboxílicos de la lignina de $\text{pK}_{\text{a}} = 5,5$ se protonan e intervienen de forma diferente en el enlace entre fibras. Propuso utilizar agua a mayor pH.

Es así que antes de la formación de las hojas de laboratorio se intercambié la pulpa a su forma calcio según técnica descripta en sección 3.1.1. Las hojas se realizaron de acuerdo a la

Técnica SCAN-C 26:79 y se acondicionaron según Técnica SCAN P2 ($50 \pm 2\%$ de Humedad y $23 \pm 1^\circ\text{C}$).

Cuando se trabajó con pulpa con finos, se utilizó una malla 200 en la formadora (en lugar de la malla 100 estándar) y una restricción a la velocidad de drenaje durante la formación de la hoja para minimizar la pérdida de finos. La restricción al drenaje elevó el tiempo de drenaje del agua sola desde 4 a 15 segundos. Para una pulpa de drenabilidad 625 mL CSF se logra así una retención del 97%.

Se formaron hojas de ensayo de 60 g/m^2 o de 130 g/m^2 según las propiedades que se deseaban estudiar.

Ventajas de las hojas de ensayo de 60 g/m^2

- Posibilita la determinación del coeficiente de dispersión de luz “s”.

Ventajas de las hojas de ensayo de 130 g/m^2

- Mejor formación
- Mejor retención de los finos
- Posibilidades de determinación de la resistencia CMT.

Una vez formadas las hojas de ensayo en forma calcio, se determinó por absorción atómica el contenido de iones Ca y iones Na. Se encontró que el papel contenía 70 % de iones Ca y 30 % de iones Na y que el contenido total de iones era mayor al contenido de grupos ácidos totales de la pulpa. Así, de estos resultados no se puede concluir que el pasaje a forma calcio haya sido total, sin embargo la relación cantidad de iones Ca / cantidad de iones Na se mantuvo en las distintas hojas analizadas.

3.3. DETERMINACIONES SOBRE LAS HOJAS DE ENSAYO

3.3.1 Número kappa

El número *kappa* se determinó según Norma Tappi 236 om-99. Es el volumen (en mililitros) de una solución 0,1N de permanganato de potasio en medio ácido consumido por un gramo de pulpa seca bajo condiciones establecidas: 25°C; 10 min.

A la pulpa se le agrega KMnO_4 de tal manera que quede un exceso entre 30%-70%, el cual se titula con tiosulfato de sodio 0,2N.

Cálculos:

El número kappa se calcula de la siguiente manera:

$$K = \frac{p \cdot f}{w} \quad (3.5) \quad \text{y} \quad p = \frac{(b - a) \cdot N}{0,1} \quad (3.6)$$

donde:

K = Número kappa

f = factor de corrección al 50 % de consumo de permanganato, de tablas según el valor de p

w = peso de muestra seca, g

p = cantidad de permanganato 0,1N consumidos por la pulpa, mL

b = cantidad de tiosulfato consumido en la determinación del blanco, mL

a = cantidad de tiosulfato consumido por la pulpa, mL

N = normalidad del tiosulfato

Ragnar (2000) cita a Li (1999) quien mostró que el número *kappa* es una medida no sólo de la cantidad de lignina, sino que también es una medida de la cantidad total de estructuras oxidables presentes en la pulpa. Es importante tener en cuenta que los dobles enlaces de los ácidos hexenurónicos de las hemicelulosas generados durante el pulpado *kraft* también son reactivos hacia el permanganato de sodio utilizado para la determinación del número *kappa*.

3.3.2. Densidad Aparente

La densidad aparente se calcula luego de determinar el espesor de las hojas y el gramaje de las mismas utilizando la Norma Tappi T220 sp-01.

Gramaje (Norma Tappi T410 om-02): se define como el peso de la hoja acondicionada por unidad de área.

Espesor (Norma Tappi T411 om-97): se mide el espesor de la hoja utilizando un micrómetro automático, el cual aplica a una velocidad específica una presión mecánica de 0,1 MPa sobre la hoja. El valor es afectado por la rugosidad por lo que, para minimizarlo, se determina el espesor de cinco hojas medidas simultáneamente.

Luego se calcula la densidad aparente:

$$Densidad_{aparente} (g / cm^3) = \frac{5 \cdot Gramaje(g / m^2)}{1000 \cdot Espesor(mm)} \quad (3.7)$$

3.3.3. Resistencia a la tracción

La resistencia a la tracción es la carga de rotura sobre una probeta de papel.

Para esta determinación se utilizó un equipo del tipo péndulo (Norma Tappi T404 cm-92) el cual aplica una carga creciente. Probetas de papel de 15 mm de ancho se sujetaron en el equipo entre mordazas separadas 100 mm.

Se estableció una velocidad constante de 150-200 mm/seg (para las hojas de gramaje 60 g/m²) para que la ruptura de la probeta ocurra entre los 10 – 15 seg.

Luego, se expresa la resistencia a la tracción como índice:

$$Índice_{de\ tracción} (Nm / g) = \frac{Carga(N)}{0,015m \cdot Gramaje(g / m^2)} \quad (3.8)$$

3.3.3.1. Resistencia a la tracción zero-span

Esta propiedad determina la resistencia a la tracción en el momento en que ocurre la falla a la tracción de las fibras orientadas aleatoriamente en una hoja. Es una medida de la máxima resistencia de la pulpa y relacionada con la resistencia de las fibras propiamente dichas. Para realizar este ensayo se utilizó la Norma Tappi 231 cm-96.

3.3.4. Resistencia al aplastamiento de onda (CMT)

Se aplicó la Norma Tappi T809 om-99 por la cual una vez ondulada la tira de papel, se fija con una cinta adhesiva y se somete a un ensayo de compresión en el plano mediante una prensa. El ensayo determina el esfuerzo máximo (N) de aplastamiento de 10 ondas. En esta Tesis se ensayó sin tiempo de espera entre ondulación y compresión (CMT₀).

3.3.5. Resistencia a la compresión de columna corta (SCT)

Se determinó según Norma Tappi 826 pm-92. Compresión de la tira de papel de 15 mm sujeta con mordazas separadas inicialmente 0,7 mm. La baja relación de “alto de columna de compresión” a “espesor de papel” (baja relación de esbeltez) hace que se produzca compresión pura y no exista pandeo de la columna. Numéricamente, el valor calculado como resistencia por unidad de longitud transversal resulta siempre superior al valor de aplastamiento de anillo (RCT). El ensayo de SCT presenta menor dispersión que el RCT.

3.3.6. Coeficiente específico de dispersión de luz (s)

El coeficiente de dispersión de luz (s) se determinó según Norma SCAN C 27:76 pero a partir de medidas de reflectancia a 681 nm (Filtro 1) del equipo Carl Zeiss Elrepho.

Sobre la base de que este coeficiente es relativamente independiente de la longitud de onda, se eligió 681 nm en lugar de la longitud de onda 557 nm propuesta en la Norma Tappi para incrementar la diferencia entre los valores de R_{∞} y R_0 necesarios para el cálculo de s.

Haynes (1998) adoptó esta longitud de onda para mediciones sobre pulpas *kraft* no blanqueadas.

Para este ensayo se utilizaron hojas de laboratorio de 60 g/m² bajo condiciones estándares de temperatura y humedad. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$s(m^2 / kg) = \frac{10^3 \cdot R_{\infty}}{(1 - R_{\infty}^2) \cdot W} \cdot \ln \left[\frac{(R_{\infty} - R_{\infty}^2 \cdot R_0)}{(R_{\infty} - R_0)} \right] \quad (3.9)$$

s = coeficiente de dispersión de luz (m^2/kg)

R_{∞} = factor de reflectancia intrínseco; siendo el factor de reflectancia la relación de radiación reflejada por un cuerpo a la reflejada por un difusor reflectante perfecto, el factor de reflectancia intrínseco es la reflectancia medida de modo que no haya transmisión de luz a través del objeto. Referido a papel significa cantidad de hojas suficientes de modo que el agregado de una más no modifica la reflectancia.

R_0 = Reflectancia de una hoja simple contra un cuerpo negro.

W = gramaje (g/m^2)

3.3.7. Coeficiente específico de absorción de luz (k)

Este coeficiente depende fuertemente de la longitud de onda de iluminación y de la composición química del material. Es proporcional a la presencia de cromóforos en el papel.

Excepto cuando se indique, este coeficiente se midió a 681 nm. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación (Giertz 1986):

$$\frac{k}{s} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} \quad (3.10)$$

donde:

k = coeficiente específico de absorción de luz (m^2/kg)

s y R_{∞} están definidos en la sección 3.3.6.

3.3.8. Teoría de la resistencia del papel. Ecuación de Page

La resistencia del papel deriva tanto de la resistencia de las fibras individuales como de la resistencia de los enlaces que mantienen unidas a las fibras.

Page (1969) propuso una ecuación que permite relacionar la resistencia a la tracción del papel con la resistencia a la tracción de las fibras individuales y la capacidad del enlace entre ellas.

La teoría presenta ciertas consideraciones:

- 1) Analiza solamente el estado de las fibras que cruzan la línea de ruptura.
- 2) Establece una relación entre la cantidad de fibras que se rompen y la cantidad de fibras que se desprenden sin romperse durante el esfuerzo de tensión.

La ecuación es:

$$\boxed{\frac{1}{T} = \frac{9}{8Z} + \frac{12A\rho g}{bPL(RBA)}} \quad (3.11)$$

T = Índice de tracción, Nm/g

Z = Índice de tracción de mordazas juntas (zero-span), Nm/g

A = sección transversal de las fibras promedio

ρ = densidad del material fibroso

g = aceleración debido a la gravedad

L = longitud de las fibras

b = resistencia específica de enlace al cizallamiento

P = perímetro de la sección transversal de una fibra

RBA = Área de enlace relativa

Para una determinada pulpa los valores de A ; ρ ; L pueden considerarse constantes y la ecuación puede escribirse como sigue:

$$\frac{1}{T} = \frac{9}{8Z} + \frac{1}{(b/k)(RBA)} \quad (3.12)$$

Donde: $k = \frac{12c}{PL}$ (3.13)

c : *Coarseness* de la fibra (peso por unidad de longitud).

b/k : proporcional a la resistencia específica de enlace

Por otro lado, el RBA puede estimarse a partir de:

$$RBA = \frac{s_0 - S}{s_0} \quad (3.14)$$

donde S y S_0 : Coeficientes de dispersión de luz de la hoja y de la hoja no unida, respectivamente

Finalmente la ecuación (3.15) muestra que la resistencia a la tracción depende de un término relacionado con la resistencia de la fibra propiamente dicha y un término relacionado con la resistencia del enlace:

$$\boxed{\frac{1}{T} = \frac{1}{F} + \frac{1}{B}} \quad (3.15)$$

F= relacionado con la resistencia de las fibras a la rotura

B= Índice de resistencia de enlace de Page. Relacionado con la resistencia del enlace a la rotura en el cual interviene tanto el RBA como el b.

Gurnagul y col. (2001) enfatizaron que el modelo sólo puede ser aplicado sobre la fracción fibrosa de la pulpa y cuando el índice de curvado es constante. Destacaron además que si la resistencia a la tracción zero-span es constante, cambios en resistencia a la tracción son adjudicables exclusivamente a cambios en resistencia de enlace.

3.3.9. Análisis de la fracción fibrosa considerando la ecuación de Page

El uso de la fracción fibrosa respecto a la pulpa completa presenta algunas ventajas:

- 1) Permite una mejor identificación de efectos. En principio es favorable su mayor homogeneidad dado que, desde el punto de vista químico, fibras y finos presentan diferencias como, por ejemplo, distinto contenido de lignina y extractivos.
- 2) Se evita la pérdida de material (finos) durante los tratamientos, los lavados de la pulpa y en la formación de las hojas.
- 3) Permite aplicar la Teoría de Page de la resistencia a la tracción.
- 4) La menor capacidad de enlace de la pulpa sin fracciones medias y finos hace que su falla en el papel ante una sollicitación mecánica, sea en gran parte dependiente de la capacidad de enlace de las mismas. A continuación se fundamenta esta afirmación.

Teniendo en cuenta la ecuación (3.15) y considerando que la resistencia zero-span es 133 Nm/g (como es el caso de la pulpa utilizada en esta Tesis) se puede graficar el índice de resistencia a la tracción (T) en función del índice de resistencia del enlace de Page (B) (**Figura 3.7.**).

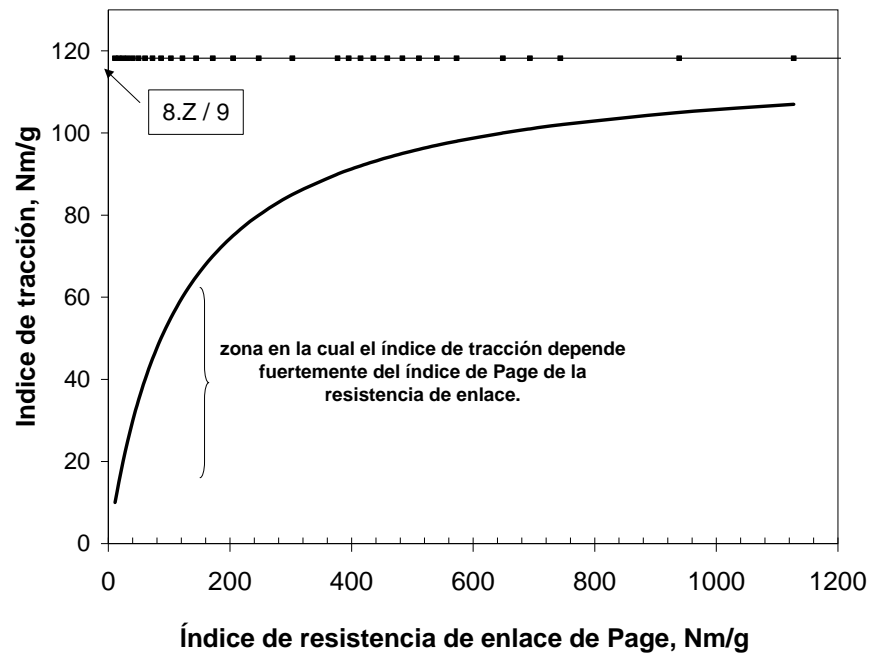


Figura 3.7. Índice de tracción en función del índice de resistencia de enlace de Page para un valor de $Z = 133 \text{ Nm/g}$

De esta gráfica se observa que cuando los niveles de resistencia a la tracción son bajos (caso en que las hojas se realizaron a partir de pulpa sin finos), ésta depende fuertemente de la resistencia del enlace, y cuando la resistencia a la tracción es elevada depende más de la resistencia de las fibras individuales.

La ecuación de Page nos permite incluso estimar la proporción de fibras que cruzan la zona de rotura del papel y que absorben la carga hasta que se rompen (n_r) en relación a la proporción de fibras que se desprenden intactas (n_p):

$$\frac{n_f}{(n_f + n_p)} = \frac{9T}{8Z} \quad (3.16)$$

n_f = número de fibras que cruzan la zona de ruptura y toman la carga hasta la ruptura y luego se rompen.

n_p = número de fibras que cruzan la zona de ruptura que salen intactas debido a que primero se rompe el enlace entre ellas.

Z = Resistencia a la tracción zero-span.

T = Resistencia a la tracción de la probeta.

Para las fibras usadas en esta Tesis (índice de resistencia a la tracción zero-span 133 Nm/g e índice de resistencia a la tracción entre 20 y 40 Nm/g), entre el 66% y el 83% de las fibras se desprenderán en la zona de ruptura durante el esfuerzo de tracción.

La **Figura 3.8** muestra que en la zona de ruptura del papel existe gran cantidad de fibras intactas que son desprendidas durante la ruptura (**I**), comportamiento contrario a cuando se realiza el ensayo de tracción zero-span donde todas las fibras se rompen (**II**).

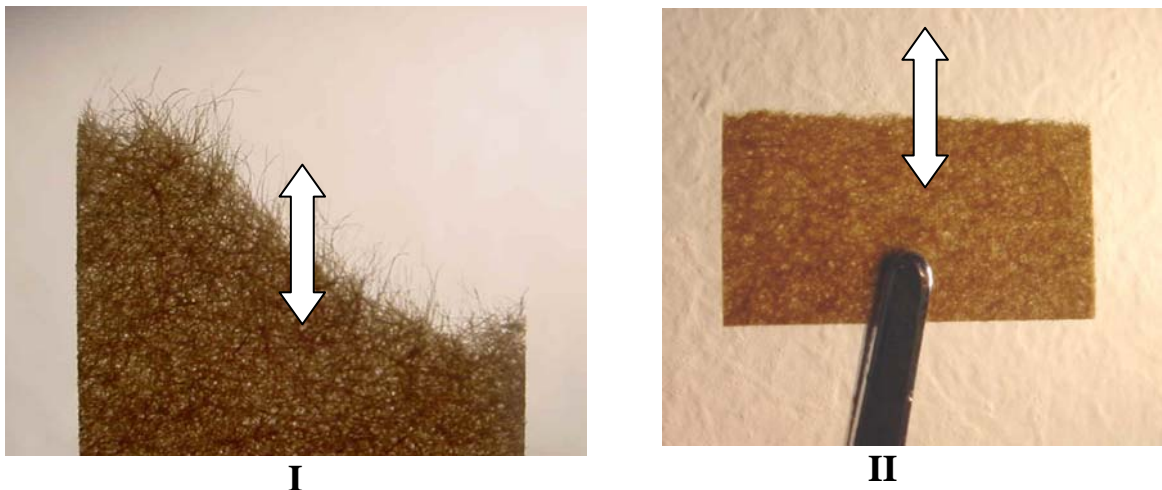


Figura 3.8. Fotografías de probetas ensayadas a la tracción de un papel realizado a partir de la fracción fibrosa de pulpa kraft de conífera no blanqueada reciclada (gramaje 60 g/cm²). (**I**): ensayo a la tracción (21,9 Nm/g). La zona de ruptura del papel muestra que existe una gran cantidad de fibras intactas que fueron desprendidas durante la ruptura del papel. (**II**): ensayo zero span (133 Nm/g). Todas las fibras son cortadas y ninguna desprendida. Ancho de probeta 15 mm.

Este análisis permite concluir que para las condiciones de trabajo de esta Tesis cuando se utilizó la fracción fibrosa R30, la ruptura del papel a esfuerzos de tracción se debe principalmente a la falla en el enlace interfibrilar.

Así, incrementos en resistencia a la tracción pueden relacionarse con incrementos en la resistencia de enlace.

3.3.10. Demanda química de oxígeno

Indica la cantidad de oxígeno procedente del dicromato de potasio que, bajo determinadas condiciones de trabajo, reacciona con el contenido de sustancias oxidables.

Se utiliza un *kit* de Hach®. En forma breve, se colocan 2 mL de la solución cuya DQO se desea determinar en tubos conteniendo H₂SO₄; K₂Cr₂O₇ y sulfato de plata como catalizador. Se realiza una digestión a 160°C y luego se mide en un espectrofotómetro la concentración de iones Cr₂O₇⁻² no consumidos durante la reacción. Conociendo que 1 mol de K₂Cr₂O₇ es equivalente a 1,5 mol de O₂ se puede determinar los mg O₂/ L solución.

3.3.11. Valoración de la actividad lacasa de un extracto crudo del hongo *Trametes hirsuta*.

Se utilizó un extracto enzimático extracelular con actividad lacasa aislado de cultivos del hongo de pudrición blanca *Trametes hirsuta*.

Este extracto fue suministrado por el Instituto VTT, Espoo, Finlandia, como un extracto enzimático parcialmente purificado y libre de actividad de otras enzimas oxidativas.

Con la finalidad de mantener estable la actividad enzimática del extracto, y así reducir la desnaturalización de las proteínas lacasa, se fraccionó el extracto en alícuotas de 5 mL que se almacenaron a -5 °C, siendo sólo una vez descongeladas previo al inicio de los experimentos.

Según lo informado por el Instituto VTT, la actividad lacasa del extracto fue de 5250 nkat/mL (un nanokatal (nkat) equivale a 1 nmol de sustrato oxidado por segundo) siendo valorada utilizando un espectrofotómetro UV-Vis bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura de reacción: 40°C
- pH de la reacción: 5,0
- Sustrato 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS.

En nuestro laboratorio, la actividad lacasa del extracto descongelado se determinó según el método de Guillén y col. (1992), utilizando como sustrato guayacol (o-metoxifenol) (**Figura 3.9**). Se midió la absorbancia del producto de oxidación del guayacol vía la actividad lacasa a 465 nm

($\epsilon_{465}=12100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro UV-Vis CECIL 3055. La actividad enzimática se expresó como nkat/mL.

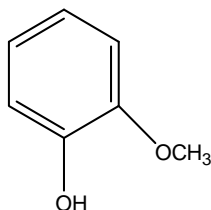


Figura 3.9. Estructura del guayacol

A continuación se describe cómo se determinaron las condiciones estándares para valorar la actividad lacasa utilizando guayacol como sustrato.

3.3.11.1 Determinación de las condiciones estándares para valorar la actividad lacasa

Para establecer las condiciones estándares para valorar la actividad lacasa utilizando guayacol, y en este sentido, garantizando la independencia de la velocidad de reacción respecto a la concentración de sustrato, se realizaron determinaciones con cantidades crecientes de este sustrato.

En un baño a 25°C se colocaron tubos de ensayo conteniendo sustrato guayacol (7,5; 10,0; 12,5 y 17,5 mM), *buffer* acetato de sodio-ácido acético 38 mM y agua destilada, a los cuales se le agregó una alícuota del extracto enzimático descongelado. Se agitó y se midió la absorbancia en función del tiempo (**Figura 3.10**).

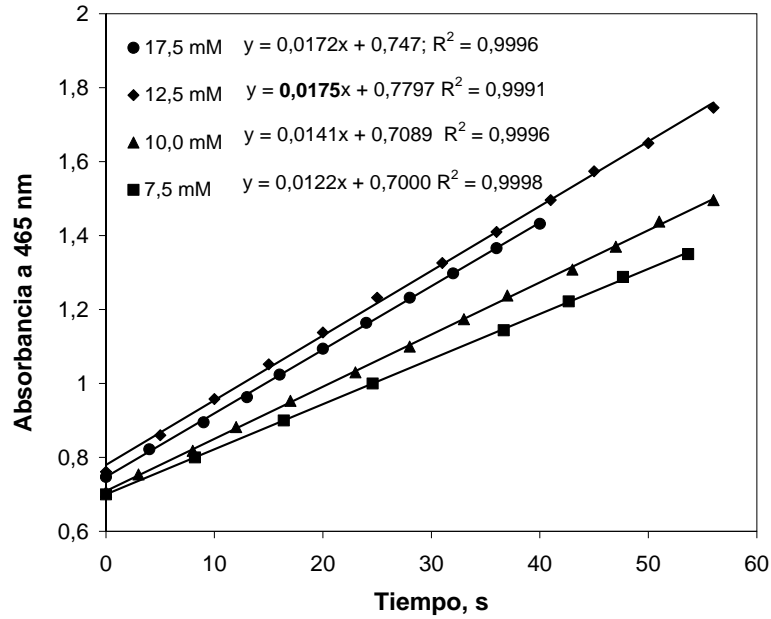


Figura 3.10. Absorbancia a $\lambda = 465$ nm del producto de oxidación del sustrato guayacol a distintas concentraciones (desde 7,5mM a 17,5 mM) en función del tiempo. Se muestran las pendientes de las líneas de regresión.

Se observa en la **Figura 3.10** que a mayor concentración de sustrato el incremento de la absorbancia a 465 nm adquiere una mayor pendiente; sin embargo cuando se aumentó la concentración desde 12,5 mM a 17,5 mM, la pendiente prácticamente no se modificó.

Las pendientes de las curvas se relacionaron con las velocidades iniciales de transformación de reactivo a producto mediante la ecuación (3.17):

$$v_{inicial} \left[\frac{\text{nkcat}}{\text{ml}_{enzima}} \right] = \frac{\text{Pendiente}}{a \cdot b} \cdot \frac{V_{reacción} \cdot 10^9}{V_{enzima}} \quad (3.17)$$

Donde;

$v_{inicial}$ = velocidad inicial [nkcat/mL extracto enzimático]

Pendiente = Pendiente de la recta Absorbancia vs. tiempo [1/seg] de la **Figura 3.10**

$V_{reacción}$ = volumen final de reacción [mL]

V_{enzima} = volumen de extracto enzimático agregado [mL]

a = coeficiente de absortividad = 12100 [M.cm]⁻¹

b = longitud de camino óptico [cm]

La **Figura 3.11** muestra las velocidades iniciales de reacción reveladas por el extracto descongelado en función de la concentración de sustrato. Se observa que al aumentar la

concentración de sustrato, la velocidad inicial aumenta hasta que alcanza un máximo a 12,5 mM de sustrato guayacol.

Se considera que las proteínas enzimáticas del extracto revelan cinética de reacción de tipo Michaelis-Menten, donde las velocidades iniciales de reacción en función de la concentración de sustrato aumentan hasta un máximo. La *actividad* del extracto se definió como la velocidad inicial a la cual se alcanzó ese máximo.

Por lo tanto, bajo las condiciones de reacción ensayadas (12,5 mM o 17,5 mM de sustrato guayacol, 38 mM de *buffer* NaAc-HAc y a 25°C), la actividad enzimática fue 1440 nkat/mL de extracto enzimático.

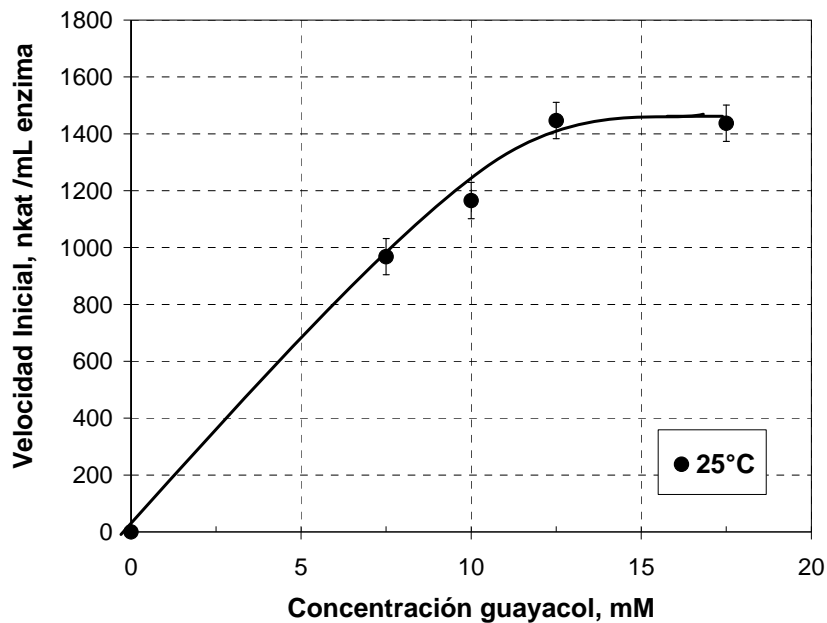


Figura 3.11. Relación entre la velocidad inicial de reacción de oxidación de guayacol vía la actividad lacasa por mL de extracto y la concentración de sustrato. Cuando la concentración de sustrato es mayor a 12,5 mM la velocidad inicial alcanza un máximo ($v_{\text{máxima}} = 1440 \text{ nkat/mL}$).

Puesto que los tratamientos enzimáticos sobre las pulpas se realizaron a 40°C, se determinó también la actividad enzimática y el efecto de la concentración de guayacol (15; 20 y 25 mM) sobre la velocidad inicial a utilizando un baño termostático a 40°C.

La **Figura 3.12** muestra las velocidades iniciales de reacción lacasa en función de la concentración de guayacol. Mientras que se observa un aumento de la actividad enzimática desde 1440 a 1900-2000 nkat/mL extracto enzimático acorde al incremento en la temperatura de reacción,

el extracto reveló similares velocidades iniciales de reacción (indicio de saturación) a las concentraciones de sustrato ensayadas a 40°C.

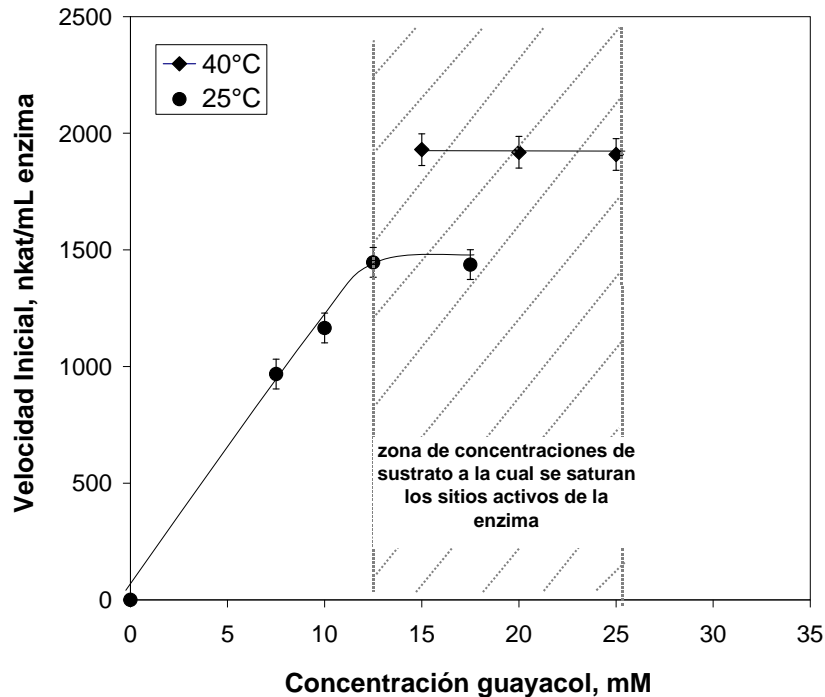


Figura 3.12. Velocidad inicial en función de la concentración de guayacol a 25°C y 40°C. La actividad enzimática a 25°C fue 1440 nkat/mL y a 40°C fue 1900 nkat/mL. Las barras de error muestran la desviación estándar de la determinación realizada por duplicado.

En base a estos resultados, antes de cada tratamiento enzimático se controló la actividad enzimática inicial agregando esta enzima a tubos de 20 mL a 40°C y pH 5,0 conteniendo:

- 20 mM de guayacol (concentración mayor a 12,5 mM para asegurarnos que el reactivo limitante nunca sea el sustrato).
- 38 mM de *buffer* acetato de sodio-ácido acético
- Agua destilada

La actividad inicial determinada sobre guayacol siempre resultó en el rango de 1930-2080 nkat/mL extracto enzimático a 40°C y pH 5,0.

3.3.11.2. Determinación de la actividad enzimática específica

Se determinó la actividad enzimática específica del extracto (nkat / mg proteína). Se calculó determinando el contenido de nitrógeno total Kjeldhal y multiplicándolo por un factor 6,25 para convertirlo a proteínas.

El contenido de nitrógeno total Kjeldhal en el extracto fue de $1,72 \cdot 10^{-3}$ g N/mL, y por lo tanto, la concentración de proteínas fue de 10,75 mg proteínas/mL extracto enzimático.

Así, la actividad específica fue de 193 nkat/mg proteína.

3.3.12. Método fenol/sulfúrico para la cuantificación del almidón catiónico

Este método consiste en colocar en tubos de ensayo 1 mL de la solución acuosa cuya concentración de azúcares se desea determinar y 1 mL de fenol 5% (p/v). Luego, desde un dispenser se agregan rápidamente 5 mL de H₂SO₄ concentrado (95,5 - 96,5 %). Se agita, se deja en reposo 10 min, luego se vuelve a agitar, y se coloca en un baño a 23-30°C por 20 min. La generación de color se mide por espectrofotometría a 490 nm. Para convertir los azúcares a almidón se multiplica por 0,899 (relación: $PM_{\text{monomero del almidón}}/PM_{\text{glucosa}}$).

La curva de calibrado se realizó con soluciones estándares de glucosa en NaCl 10⁻³N a distintas concentraciones (**Figura 3.13**). El blanco se realizó de la misma manera excepto que se agregó a los tubos de ensayo 1 mL de solución de NaCl 10⁻³N en lugar de 1 mL de solución de glucosa.

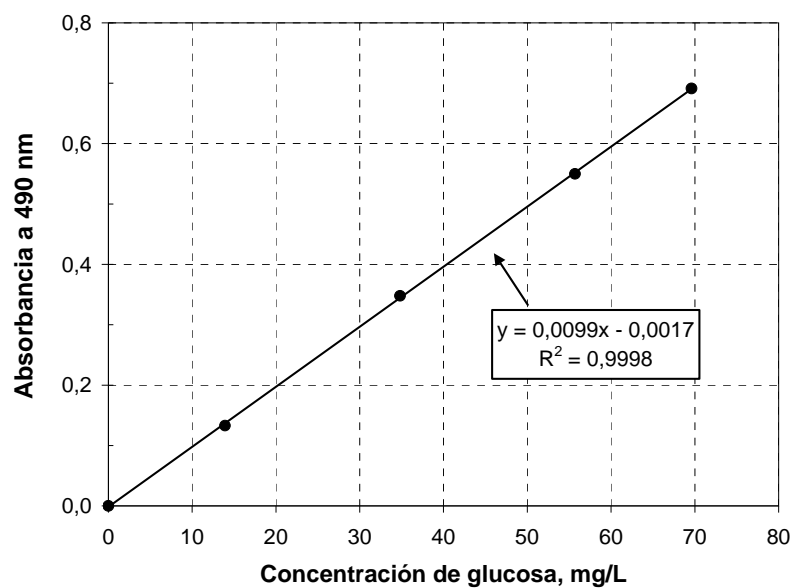


Figura 3.13. Curva de calibrado de glucosa. Se indica en la gráfica la línea de regresión y el coeficiente de determinación.

Observación: Las determinaciones de extractivos, holocelulosa, contenido de lignina y caracterización de la lignina aislada se realizaron en la Universidad Federal de Paraná, Curitiba, Brasil en el marco del proyecto en cooperación SECyT-CAPES. La DQO se determinó en el INGAR, Santa Fe, Argentina. La SCT se realizó en INTI Celulosa y Papel, Bs.As.
