
Capítulo 10

Determinación de los Hidratos de Carbono Presentes en la Pasta Mediante la Técnica de HPLC.

RESUMEN

El análisis de los azúcares presentes en la pasta de papel mediante HPLC, se ha propuesto como método para conocer la evolución de los polisacáridos (celulosa y xilanos) durante las secuencias de blanqueo. Primeramente ha sido necesario una adaptación y optimización de la metodología utilizada. Una vez hallado el método idóneo, pastas TCF y ECF con y sin pretratamiento enzimático han sido analizadas según dicho procedimiento con el fin de obtener la proporción entre los hidratos de carbono presentes en las pastas. El contenido de xilosa disminuye conforme las pastas son blanqueadas. El tratamiento con xilanasa reduce de forma importante el contenido en xilosa.

INTRODUCCIÓN

Una vez hallada la secuencia TCF que incluye una etapa de blanqueo con ozono, en la que se consigue aumentar la selectividad del proceso, y un pretratamiento enzimático, se pasa a la parte de la tesis en la que se pretende conseguir mayor información para poder dar una visión más básica y comprender mejor el beneficio de los diferentes estadios de blanqueo realizados en dicha secuencia. Se empieza pues con este capítulo, una serie de estudios con la utilización de diferentes técnicas para conseguir el propósito antes mencionado.

En el presente capítulo se determina la composición de hidratos de carbono presentes en diferentes pastas estudiadas en anteriores capítulos. El motivo de esta investigación reside en el hecho de que probablemente se pueda establecer una relación entre la composición de hidratos de carbono con la respuesta obtenida durante el blanqueo y con el desarrollo de las propiedades de la pastas y de los papeles.

Antes de obtener los resultados definitivos, se debió poner en marcha y adaptar la metodología de determinación de azúcares para pastas de papel de *Eucalyptus globulus*. La técnica

utilizada ha sido cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-High Performance Liquid Chromatography).

Anteriormente en nuestro laboratorio se habían realizado estudios de determinación de azúcares en pasta de papel (NAVAS y COLOM, 1980; VIDAL, 1982) mediante cromatografía de gases, siguiendo la norma T 249 pm-75, enviándose a TAPPI una serie de sugerencias para mejorar la metódica de preparación de la muestra, puesto que se habían hallado algunos problemas en el momento de poner en práctica dicha norma (VIDAL y COLOM, 1984). También existen unas modificaciones recomendadas por BORCHARDT y EASTY (1982), y McDONALD y GARBY (1983) para la mejora de dicha norma. De hecho, la propia norma sugiere que se realice una adaptación de la misma para cada tipo de pasta que se quiera analizar.

Para pasar una muestra de pasta por cualquier técnica de cromatografía antes debe realizarse una hidrólisis a fin de obtener los monosacáridos correspondientes para así poder ser cuantificados. El problema adicional que presenta la utilización de la cromatografía de gases es que, además, debe realizarse una reducción y posterior acetilación de los monosacáridos puesto que no son volátiles. Esto complica y hace más laboriosa la preparación de la muestra antes de ser analizada. Con la cromatografía líquida HPLC se consigue simplificar la metódica, ya que solamente es necesaria la hidrólisis de la muestra. Algunos autores se inclinan por utilizar otras técnicas para la determinación de azúcares como son la electroforesis capilar (RYDLUND y DAHLMAN, 1995; SJÖBERG y DAHLMAN, 2000), la espectroscopia NMR (BUCHERT *et al.*, 1995; TELEMAN *et al.*, 1995) y la espectroscopia NIR (SCHIMLECK *et al.*, 1997).

Después de realizar una búsqueda bibliográfica, se observó una cierta discrepancia en cuanto a la metódica a utilizar para la realización de la hidrólisis de muestras de pasta para papel. La norma TAPPI anteriormente mencionada, efectúa una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico y antes de pasar la muestra a analizar debe ser neutralizada a fin de que el sulfúrico no perjudique la columna. Según algunos autores (HAUSALO, 1995; TELEMAN *et al.*, 1995; TENKANEN *et al.*, 1995), el riesgo que se tiene con esta hidrólisis es el de destruir algunos de los azúcares, especialmente pentosas y ácidos urónicos. Es por eso que algunos investigadores se inclinan por la utilización de ácido trifluoroacético (TFA), cuya hidrólisis parece ser más suave (PHAM *et al.*, 1995; RYDLUND y DAHLMAN, 1995), aunque otros consideran que el riesgo de esta hidrólisis está en que sea incompleta (GUGGENBERGER *et al.*, 1994; TENKANEN *et al.*, 1995). También, existen estudios de la posibilidad de utilizar enzimas para conseguir una hidrólisis eficiente de la muestra (HAUSALO, 1995; TELEMAN *et al.*, 1995; TENKANEN *et al.*, 1995; BUCHERT *et al.*, 1995 y 1996), aunque también parecen presentar el problema de una hidrólisis incompleta, lo cual es comentado por los propios autores considerando pues la necesidad de una optimización del método.

Una vez desarrollada la metódica de preparación de la muestra y de utilización de la técnica HPLC, se pasó a realizar las determinaciones sobre las muestras a estudiar. Las pastas

analizadas fueron obtenidas por diferentes secuencias TCF (Capítulos 6 y 8) y ECF (Capítulo 8), cuya determinación de los hidratos de carbono permitió ver los efectos, en su composición de: **a)** el tratamiento enzimático con xilanasas; **b)** el punto de aplicación de la enzima; **c)** la aplicación del aditivo ácido oxálico, el tratamiento reductor y de los dos tratamientos conjuntamente; **d)** la dosis de ozono y reactivos de blanqueo; así como, **e)** la diferencia entre secuencias ECF y TCF en pasta de *Eucalyptus globulus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Para realizar la adaptación de la metodología de determinación de azúcares por HPLC se utilizó pasta kraft cruda de *Eucalyptus globulus*. Una vez hallado el procedimiento adecuado para este tipo de materia prima, se procedió a realizar las determinaciones de hidratos de carbono en diferentes pastas TCF descritas en capítulos anteriores y pastas ECF, todas a partir de pasta kraft de eucalipto. Dichas secuencias han sido:

- **TCF**
 - XOZP, XOAZP, XOZRP y XOAZRP (Capítulo 6)
 - OAZ₁RP y OAZ₂RP (Capítulo 8)
- **ECF**
 - OXDP, XODP y ODP

Los análisis de hidratos de carbono se realizaron después de cada etapa de blanqueo en todas las secuencias antes mencionadas.

Metódica de las diferentes hidrólisis realizadas

Antes de realizar las hidrólisis de las pastas para la posterior determinación de los azúcares presentes, se realizó una extracción en una mezcla de alcohol-benceno (1:2) para eliminar los extractivos presentes en la pasta (Norma UNE 57035-74).

Los ensayos de determinación de hidratos de carbono se llevaron a cabo en los “Servicios Científico-Técnicos” de la Universidad de Barcelona.

Hidrólisis con Trifluoracético (TFA)

Se introducen aproximadamente 25 mg de pasta seca en 10 mL de ácido trifluoracético (TFA) 4 M, se desgasifica con nitrógeno para eliminar el oxígeno y se deja reaccionar 24 horas a 100°C. Finalizada la hidrólisis, la muestra se evapora secando con N₂ para eliminar el residual de TFA y una vez secada, se redissuelve en una cantidad conocida de agua, para poder determinar los azúcares por HPLC.

Como para la determinación de azúcares se utiliza el método del patrón interno, se introducirá una cantidad perfectamente conocida de inositol en la muestra después de la hidrólisis.

Hidrólisis con ácido sulfúrico

El proceso de hidrólisis con ácido sulfúrico consta de los siguientes pasos:

- a) Pre-hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado: Se introducen aproximadamente 50 mg de muestra problema en tubos de ensayo y se impregnan totalmente con ácido sulfúrico al 72% (aproximadamente 0,5 mL). Se colocan en agitación suave durante 4 horas a temperatura ambiente.
- b) Hidrólisis final con ácido sulfúrico diluido: Se adiciona agua destilada (aproximadamente 6,8 mL) hasta obtener una disolución de H_2SO_4 al 0,5M. Esta adición se realiza en un baño de hielo con agitación continua para minimizar el choque térmico. Se lleva a cabo la digestión (105-110 °C) durante 4 horas. Finalizada la reacción se añade una cantidad conocida (1 mL) de inositol (patrón interno) y se procede a la filtración de la muestra a través de un filtro de vidrio, para eliminar la lignina insoluble en ácido sulfúrico. El filtrado obtenido se enrasa a un volumen conocido (matraz aforado de 20 mL).
- c) Neutralización de la muestra: La neutralización puede llevarse a cabo sobre una alícuota (0,5 mL) de la muestra filtrada. Se añade carbonato sódico (Na_2CO_3) hasta el cese de burbujeo. Se evapora todo el líquido (con N_2) y se realiza una extracción con metanol. El sobrenadante obtenido después de la decantación, se centrifuga, se seca (con N_2) y se redisuelve con agua destilada a una cantidad conocida.

Llegado a este punto, la muestra ya está lista para ser inyectada en el cromatógrafo.

Instrumento de medición

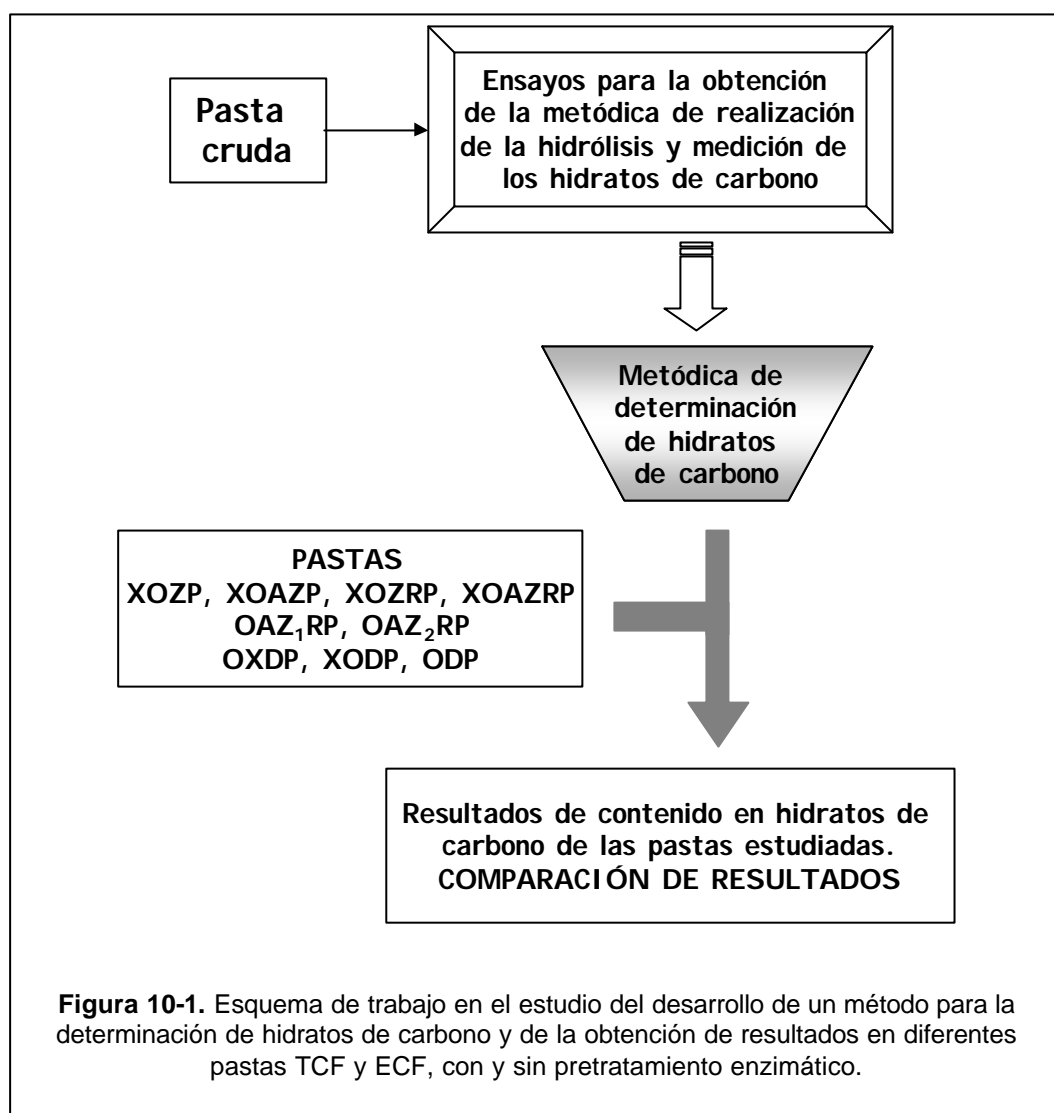
Para la medición de los azúcares presentes en las muestras hidrolizadas se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) provisto de detector de índice de refracción.

La Figura 10-1 muestra el esquema de trabajo seguido en este capítulo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del método de determinación de hidratos de carbono por HPLC

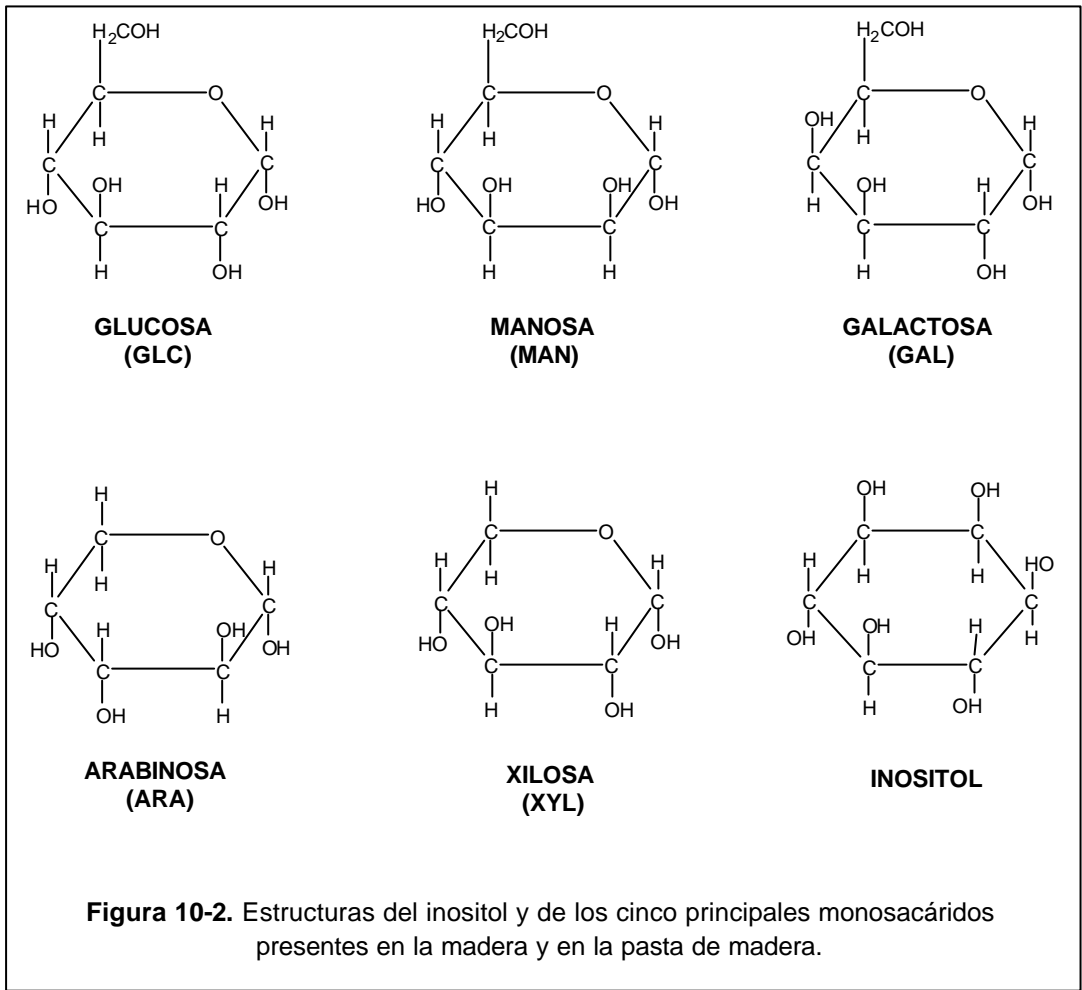
Para determinar los azúcares presentes en una muestra mediante la técnica de HPLC, debe decidirse cual será la columna y el patrón a utilizar, así como el método de preparación de la muestra para ser analizada, ya que antes debe efectuarse una hidrólisis de la misma.



Columna utilizada

Los cinco principales monosacáridos que definen la composición de hidratos de carbono presentes en la madera y en la pasta de madera son (BROWNING, 1967; NAVAS y COLOM, 1980; MDAL, 1982): Glucosa (GLC), Manosa (MAN), Galactosa (GAL), Arabinosa (ARA) y Xilosa (XYL) (Figura 10-2). Para determinar los tiempos de retención a los que aparecen estos monosacáridos deben prepararse disoluciones patrón de cada uno de los azúcares. La columna idónea para determinar estos hidratos de carbono debe ser capaz de separarlos y hacerlos aparecer a diferentes tiempos de retención para así ser fácilmente identificados.

Se prepararon muestras patrón de cada uno de los cinco monosacáridos a una concentración de 4 mM, y se inyectaron 20 μ L en el cromatógrafo HPLC.



En un primer ensayo se utilizó la columna AMINEX HPX-87C (resina cambiadora de cationes con la forma iónica Ca^{2+}), puesto que según la información técnica de la misma, es una columna utilizada para la determinación de este tipo de azúcares. Obtenidos los cromatogramas, se observó un solapamiento de los picos correspondientes a la manosa, galactosa y xilosa. Con el fin de separar estos componentes, se pusieron dos columnas en serie (la anteriormente mencionada y la AMINEX HPX-87P), ambas aptas para la identificación de hidratos de carbono. Sin embargo, al poner las dos columnas en serie, tenía lugar una pérdida de presión.

Buscando información técnica sobre la segunda columna AMINEX HPX-87P, se descubre que es una columna adecuada para la separación de pentosas y hexosas presentes en productos de celulosa, y que está especialmente indicada para detectar celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa. Además, proporciona elevada resolución y selectividad en el análisis de monosacáridos derivados de la celulosa, y es recomendable para la separación de preparaciones que contienen cantidades elevadas de hidratos de

carbono, donde una gran cantidad de uno de los monosacáridos puede enmascarar una pequeña cantidad de otro de ellos. Esta información se corrobora al hacer pasar las muestras patrón solamente por esta columna, y observar que se separan correctamente. Únicamente hay un ligero solapamiento de los picos correspondientes a la manosa y a la arabinosa, que no resulta ser un problema puesto que en el tipo de pasta que se va a analizar (pasta kraft de *Eucalyptus globulus*), las cantidades de estos monosacáridos son pequeñas o incluso nulas (NAVAS y COLOM, 1980; VIDAL, 1982).

Por tanto, se decide tomar la columna AMINEX HPX-87P, que es una columna que contiene un relleno de una resina cambiadora de cationes con la forma iónica Pb^{2+} . Las condiciones de operación han sido: agua para la fase móvil (eluyente), 0,6 mL/min de caudal, 85°C de temperatura y 30 bar de presión.

Pasadas las muestras patrón de los monosacáridos, se han obtenido aproximadamente los siguientes tiempos de retención (min):

Glucosa (GLC)	11,10
Xilosa (XYL)	12,15
Galactosa (GAL)	13,45
Arabinosa (ARA)	14,78
Manosa (MAN)	14,92

Y los tiempos de retención de los reactivos utilizados:

TFA	7,73
H ₂ SO ₄	12,6
Inositol	19,72

Elección del patrón interno y método de cálculo

Para el análisis cuantitativo de los monosacáridos, se ha empleado el método de patrón interno, que consiste en adicionar en la muestra problema a analizar, una cantidad perfectamente conocida de un producto que no sea afectado por las condiciones de hidrólisis de preparación de la muestra. Como patrón interno se ensayaron la glicerina (HOCH₂CH(OH)CH₂OH) y el inositol (C₆H₁₂O₆) que no interfieren en las determinaciones correspondientes. La glicerina dio lugar a un pico a un tiempo de retención de 18,28 min y el inositol a 19,72 min. Ambos picos aparecen bastante apartados de los correspondientes a los monosacáridos a determinar. Sin embargo, se decide finalmente tomar el inositol como patrón interno porque su correspondiente pico es mucho más nítido que el de la glicerina, además de aparecer más separado del resto de picos. Su estructura molecular aparece en la Figura 10-2.

Para el análisis cuantitativo deben calcularse primeramente los factores de respuesta. Para ello se inyectó en el aparato una solución que contenía una concentración conocida de los patrones de monosacáridos y de inositol. A partir de las áreas de los picos obtenidos y de la

concentración aplicada, puede determinarse el factor de respuesta. Así pues, por ejemplo, el factor de respuesta para la glucosa se determina a partir de la siguiente expresión:

$$Fr_{GLC} = \frac{\text{área pico inositol}}{\text{área pico glucosa}} \times \frac{\text{concentración glucosa}}{\text{concentración inositol}} \quad \text{Ec. 10-1}$$

Y se efectúa lo mismo para cada uno de los monosacáridos patrón, obteniéndose sus correspondientes factores de respuesta.

En cada una de las muestras a analizar se añadirá una cantidad conocida de inositol, lo que permitirá la cuantificación de los monosacáridos. Cuando se inyecte la muestra problema se obtendrán los picos correspondientes a cada uno de los monosacáridos presentes en la muestra y el pico del inositol. Así pues, la concentración de glucosa, [GLC], presente en la muestra problema se calcula según la siguiente expresión:

$$[GLC] = Fr_{GLC} \times \left(\frac{\text{área pico glucosa}}{\text{área pico inositol}} \times \text{concentración inositol} \right)_{\text{muestra}} \quad \text{Ec. 10-2}$$

Se realiza lo mismo con cada uno de los monosacáridos presentes en la muestra problema, obteniéndose así su concentración.

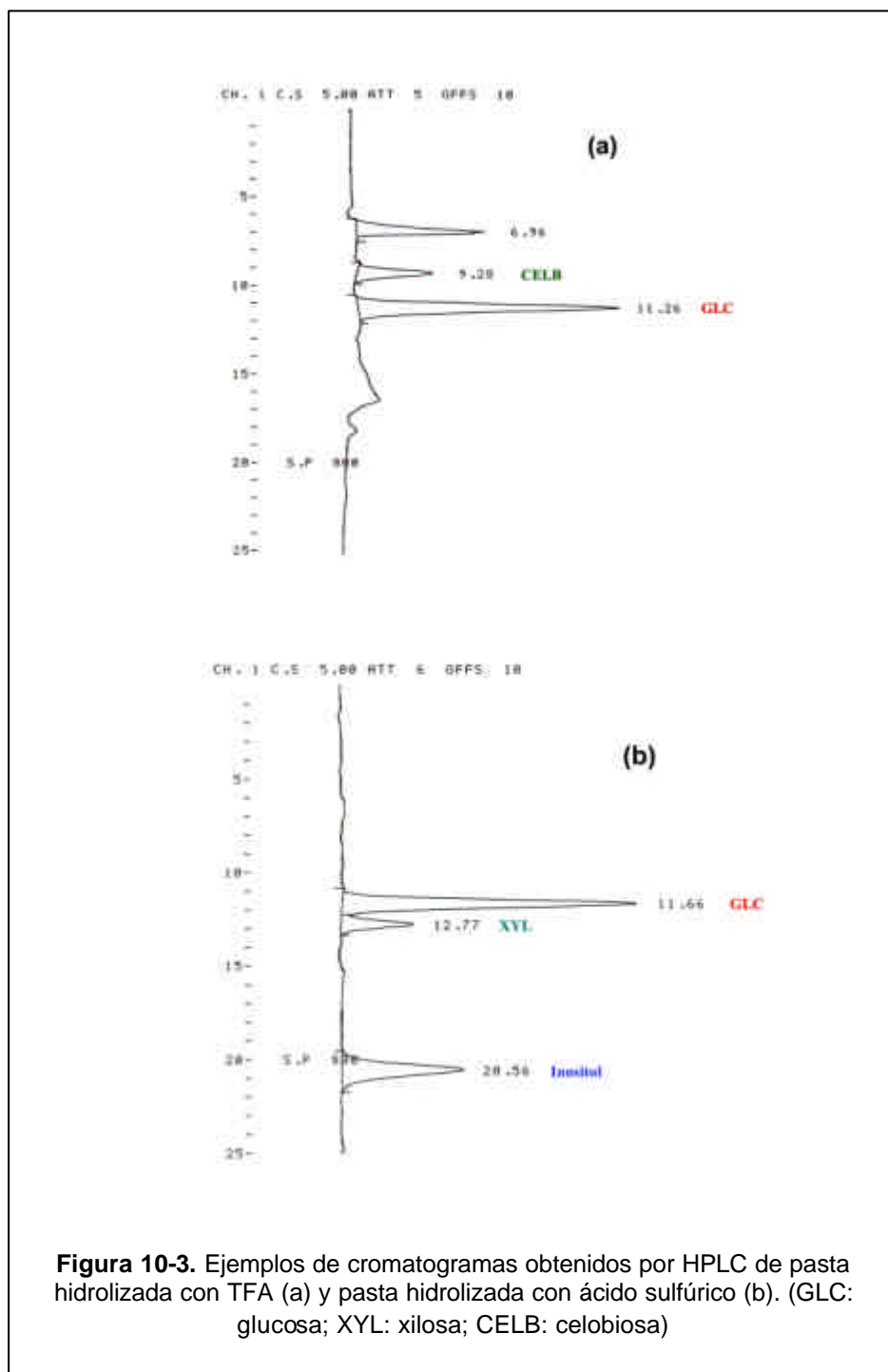
Método de hidrólisis de una muestra de pasta de papel

Como se ha indicado en la introducción, existe una cierta discrepancia en cuanto a la metodología de hidrólisis a ser utilizada en una muestra de pasta de papel. Puesto que la hidrólisis ácida con ácido sulfúrico es más laboriosa, se optó en un primer momento por realizar la hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA).

Basándose en lo publicado por algunos autores (GUGGENBERGER *et al.*, 1994; PHAM *et al.*, 1995; RYDLUND y DAHLMAN, 1995) se realizaron diferentes hidrólisis con TFA, variando el tiempo de reacción (5 - 24 h) y la dosis aplicada (2,5 – 10 mL) en pasta cruda de *Eucalyptus globulus*. En las muestras hidrolizadas durante menor tiempo, se observaba visualmente que no se conseguía una hidrólisis total, ya que aún se podía ver que la pasta no estaba disuelta.

La muestra hidrolizada con 10 mL de TFA durante 24 h fue la que parecía haber conseguido una hidrólisis total, aunque también se observaba una gran cantidad de precipitado (que en principio debía corresponder a lignina, aunque en proporción parecía demasiada cantidad). Esta muestra se inyectó en el HPLC obteniéndose un pico alrededor de 11,07 min que corresponde a la glucosa. Pero también aparecían varios picos agrupados por encima de los 15 minutos, además de un pico a 6,74 min que corresponde a hidratos de carbono de peso molecular superior a la glucosa (disacáridos, trisacáridos, ...), puesto que aparece antes. Posteriormente, conjuntamente con la muestra problema se inyectó patrón de celobiosa, apareciendo un nuevo pico a aproximadamente 9,42 min correspondiente a la celobiosa. Por

tanto, el pico que aparece en 6,74 min son polisacáridos de mayor peso molecular incluso que la celobiosa, lo que corrobora que la hidrólisis con TFA no ha sido efectiva. En la Figura 10-3 (a) se muestra un ejemplo del cromatograma obtenido con la muestra hidrolizada con TFA.



Se llega a la conclusión que el método de hidrólisis con TFA no es adecuado para la determinación de azúcares presentes en la pasta, pero probablemente sea efectivo en el caso de la determinación de monosacáridos presentes en los efluentes de una planta de blanqueo, donde los polisacáridos serán de menor peso molecular y más fáciles de hidrolizar. De hecho, GUGGENBERGER *et al.* (1994) que trabajaron con diferentes muestras vegetales y realizaron las hidrólisis con TFA, llegaron también a la conclusión que no se consigue hidrolizar totalmente, siendo necesaria una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico.

Por consiguiente, se decidió realizar la hidrólisis con ácido sulfúrico. Como ya se ha comentado anteriormente, el ácido sulfúrico presenta la dificultad intrínseca a todo proceso de hidrólisis que se realice sobre una muestra de madera o de pasta, y que consiste en las diferentes velocidades de hidrólisis de los polisacáridos, y en las distintas vidas medias de los monosacáridos en el medio ácido en que se realiza la hidrólisis. Esto último es debido a que los monosacáridos en medio ácido no son estables, y se transforman en furfural y metil-furfural (según se trate de pentosas o de hexosas), haciéndolo cada uno a distintas velocidades (ACUÑA y VILLAR, 1992). De este modo, solo cabe, después de haber realizado algunos ensayos variando la concentración de ácido y el tiempo de reacción, optar por una solución de compromiso, para conseguir el grado óptimo de hidrólisis.

En realidad, la hidrólisis se realiza en dos estadios: pre-hidrólisis con ácido concentrado e hidrólisis final con ácido diluido. Esto es debido a la presencia de lignina en este tipo de muestras vegetales. Lo que se tiene es una matriz de lignina ligada a una de hidratos de carbono. La dificultad está en hidrolizar la lignina ya que ésta es muy hidrofóbica. Por tanto, si se utiliza ácido sulfúrico diluido para realizar la hidrólisis, se dificultará el acceso del ácido sulfúrico a la matriz de lignina, de manera que no se podrá separar eficientemente la lignina de la celulosa. Por esta razón que se realiza una pre-hidrólisis con ácido sulfúrico bastante concentrado (72%). De esta manera, el sulfúrico puede acceder a la lignina separándola de los hidratos de carbono. Posteriormente, en un estadio de hidrólisis final con ácido sulfúrico diluido, se consigue hidrolizar los hidratos de carbono de forma más suave sin dañar extremadamente sus monosacáridos correspondientes.

Como el ácido sulfúrico puede dañar la columna, la muestra debe neutralizarse después de la hidrólisis final. Así pues, básicamente los pasos a realizar para la hidrólisis con ácido sulfúrico y basándose en la norma T249 pm-75 con las modificaciones sugeridas por VIDAL y COLOM (1984), son:

- a) Pre-hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado al 72%
- b) Hidrólisis final con ácido sulfúrico diluido
- c) Neutralización de la muestra

Realizados algunos ensayos previos, finalmente se consiguió la siguiente metódica de preparación de la muestra:

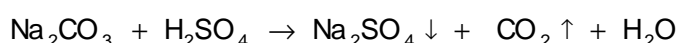
- a) Pre-hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado al 72%: Esta pre-hidrólisis se realiza en tubos de ensayo resistentes a la temperatura, en los que se añade aproximadamente 50 mg de muestra problema. Se impregna totalmente la muestra con ácido sulfúrico al 72% (aproximadamente 0,5 mL), y se colocan los tubos en un agitador de movimiento suave, durante 4 horas y a temperatura ambiente.

En el momento de añadir el ácido sulfúrico a la muestra, ésta se vuelve de color marrón intenso y la pasta permanece en suspensión. Pasado un tiempo, se advierte como la muestra se va disolviendo mientras se sigue manteniendo el color marrón oscuro. Y finalizada la pre-hidrólisis se observa que la pasta se ha disuelto, aunque no totalmente puesto que la solución todavía no es translúcida.

- b) Hidrólisis final con ácido sulfúrico diluido: Para la hidrólisis final se adiciona agua destilada (aproximadamente 6,8 mL) hasta conseguir una solución de H₂SO₄ al 0,5M. Este paso debe realizarse en un baño de hielo con agitación continua para minimizar el choque térmico. Una vez diluida la solución, se extrae el oxígeno por desplazamiento con nitrógeno, se tapa y se somete a una digestión (105-110 °C) durante 4 horas.

Finalizada la reacción, se observa que se ha formado un precipitado negro y que la solución es ahora totalmente translúcida. Una de las primeras diferencias respecto a la hidrólisis con TFA, es que en esta última la cantidad de precipitado formado era mucho mayor, lo que es seguramente debido a una hidrólisis incompleta, es decir, que algunos enlaces lignina-hidratos de carbono no habían sido hidrolizados. Una vez enfriada la muestra, se adiciona una cantidad conocida (1 mL) de inositol (patrón interno) y se procede a la filtración a través de un filtro de vidrio, para eliminar la lignina insoluble en ácido sulfúrico, que es el precipitado negro que presenta la muestra. El filtrado obtenido, cuyo color es amarillento, se enrasa a un volumen conocido (matraz aforado 20 mL).

- c) Neutralización de la muestra: Para evitar el deterioro de la columna del cromatógrafo al utilizar una muestra con un pH fuertemente ácido se realiza una neutralización, es decir, se elimina el ácido sulfúrico residual. En un primer ensayo se realizó una neutralización mediante la adición de carbonato de bario (BaCO₃), obteniendo un precipitado en forma de sulfato de bario (BaSO₄). Pero se observó que este precipitado era muy pegajoso y viscoso, por lo que en el momento de su extracción probablemente se pudieran eliminar monosacáridos que serían arrastrados por este precipitado. Por esta razón, se optó por utilizar carbonato sódico (Na₂CO₃) teniendo lugar la siguiente reacción:



Se toma una alícuota de la muestra filtrada y se añade Na₂CO₃ hasta el cese de burbujeo que indica el fin de la neutralización. Se evapora todo el líquido con N₂ y se realiza una extracción con metanol, añadiéndose metanol, se deja decantar, se recoge el

sobrenadante y se centrifuga. Después de la centrifugación se recoge el sobrenadante, realizándose varias veces las operaciones de extracción, secado con N_2 y centrifugado y se redisuelve con agua destilada a una cantidad conocida. Llegado a este punto, la muestra ya está lista para ser inyectada en el cromatógrafo.

Cuando se inyectaron las muestras hidrolizadas según el método que se acaba de describir, se observó que solamente aparecían los picos correspondientes a los monosacáridos a analizar y el correspondiente al inositol, y que no aparecían picos extraños y no identificables. En concreto, los picos que aparecen son los correspondientes a la glucosa, a la xilosa y al inositol, indicando que sólo existen estos componentes en la pasta. Esto puede ser normal ya que la madera de eucalipto inicialmente contiene bajas cantidades de galactosa, manosa y arabinosa, siendo prácticamente eliminadas durante la cocción (VIDAL, 1982). En la Figura 10-3 (b) se muestra un ejemplo de cromatograma obtenido con pasta hidrolizada con ácido sulfúrico.

Después de estos primeros análisis en los que se consigue obtener una metodología para la determinación de hidratos de carbono en muestras de pasta kraft de *Eucalyptus globulus*, se procedió a la realización del estudio de las muestras que nos conciernen.

Resultados de la determinación de los hidratos de carbono

Las pastas en las que se realizó la determinación de hidratos de carbono fueron pastas TCF (XOZP, XOAZP, XOZRP, XOAZRP (Capítulo 6) y OAZ₁RP, OAZ₂RP (Capítulo 8)) y pastas ECF (OXDP, XODP y ODP). En la Tabla 10-I se muestran todos los valores de contenidos en glucosa y xilosa después de cada etapa de blanqueo, de las pastas estudiadas antes mencionadas.

Efecto de la aplicación de un aditivo y/o un postratamiento en una secuencia TCF con y sin tratamiento enzimático. Efecto de la dosis de ozono aplicada.

Para determinar el efecto del ácido oxálico aplicado como aditivo y del borohidruro sódico aplicado como postratamiento en la secuencia TCF con pretratamiento enzimático, se comparan los resultados obtenidos después de cada etapa de las secuencias XOZP, XOAZP, XOZRP y XOAZRP.

Aditivo: En la Tabla 10-I se observa que el empleo de ácido oxálico (XOA) supone una disminución del 16,4% del contenido de xilosa respecto a la pasta XO. Esto puede ser debido a una eliminación de hemicelulosas fáciles de disolver en medio ácido, y que son eliminadas durante el filtrado de la pasta que se realiza a fin de conseguir una consistencia del 40% para efectuar el blanqueo con ozono. De hecho, en el estudio del efluente que se realiza en el Capítulo 6, se observa que el aditivo contribuye en la DQO en un 3,4% y 4,5% en las secuencias XOAZRP y XOAZP, respectivamente.

Tabla 10-I

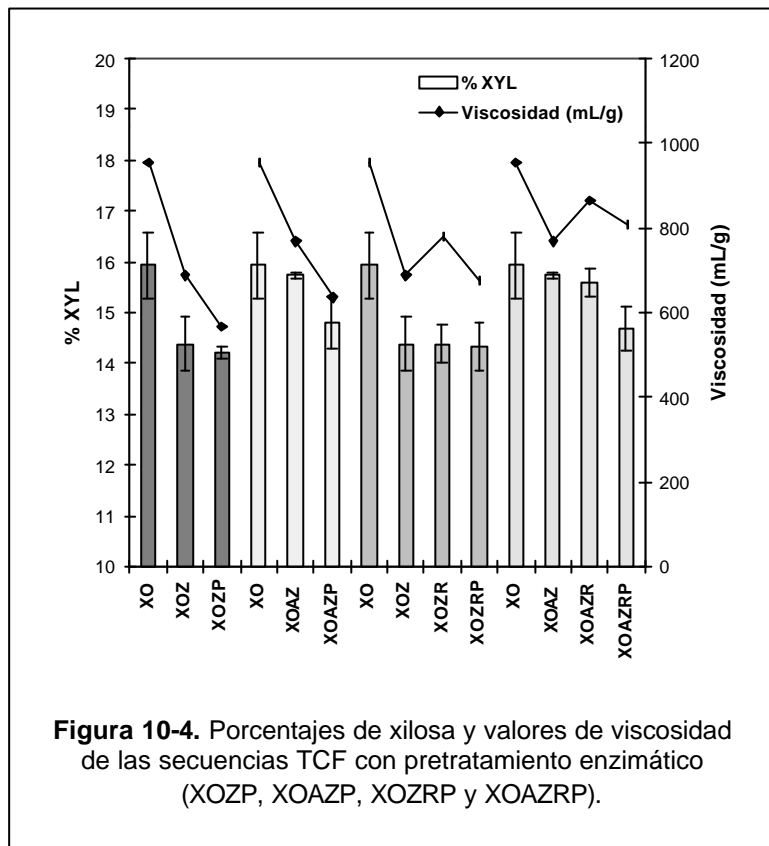
Porcentajes de glucosa (GLC) y xilosa (XYL) determinados después de cada etapa de blanqueo de las secuencias TCF (XOZP, XOAZP, XOZRP, XOAZRP, OAZ₁RP y OAZ₂RP) y de las secuencias ECF (OXDP, XODP y ODP)

Pasta		% GLC	% XYL	I.C.
TCF	Cruda	81,2	18,9	0,47
	X	83,7	16,3	0,52
	XO	84,1	15,9	0,66
	XOZ	85,6	14,4	0,53
	XOZP	85,8	14,2	0,12
	XOA	86,7	13,3	0,33
	XOAZ	84,3	15,7	0,06
	XOAZP	85,2	14,8	0,50
	XOZR	85,6	14,4	0,37
	XOZRP	85,7	14,3	0,46
	XOAZR	84,4	15,6	0,27
	XOAZRP	85,3	14,7	0,43
	O	82,9	17,2	0,83
	OA	85,3	14,7	0,73
	OAZ ₁	83,9	16,1	0,50
	OAZ ₁ R	82,5	17,5	0,69
	OAZ ₁ RP	82,8	17,2	0,90
	OAZ ₂	82,2	17,8	0,28
	OAZ ₂ R	82,1	17,9	0,15
	OAZ ₂ RP	81,6	18,4	1,05
ECF	Cruda	83,1	16,9	0,66
	O	81,9	18,1	0,89
	OD	82,0	18,0	0,35
	ODP	82,2	17,8	0,81
	OX	83,2	16,8	0,77
	OXD	83,2	16,8	0,21
	OXDP	83,3	16,7	0,09
	X	84,9	15,1	0,16
	XO	85,6	14,4	0,34
	XOD	85,6	14,4	0,51
	XODP	85,8	14,2	0,19

I.C. Intervalo de confianza con un nivel de confianza del 95%.

Ozono: En la Figura 10-4 se muestran los valores de contenido en xilosa y de viscosidad de las diferentes secuencias TCF con pretratamiento enzimático. La no utilización de aditivo en el estadio Z (XOZ vs XOAZ) produce una disminución del contenido en xilosa, resultando 14,4% y 15,7% en XYL para los tratamientos de blanqueo con ozono sin

aditivo (XOZ) y con aditivo (XOAZ), respectivamente. Si se compara XOZ (14,4% XYL) con XO (15,9% XYL) se observa una disminución del 9,7% en contenido de xilosa durante el estadio Z, lo que indicaría una eliminación de hemicelulosas. FUHRMANN *et al.* (1995) ya apuntaron en su estudio que durante el blanqueo con ozono se produce una disolución de hemicelulosas, principalmente del tipo xilosa. Si se compara XO (15,9% XYL) con XOAZ (15,7% XYL) se observa que la relación glucosa-xilosa (GLC-XYL) prácticamente se mantiene, lo que puede ser debido a que anteriormente, durante la aplicación del aditivo (XOA), ya se ha producido una eliminación de xilosa, pasando de 15,9% en XO a 13,3% en XOA.



Aunque en ambas pastas XOZ y XOAZ se produce una disolución de hemicelulosas, ya sea durante Z o durante A, la viscosidad disminuye en los dos casos, indicando también una degradación de la celulosa. Sin embargo, la viscosidad en la pasta XOAZ (768 mL/g) es superior a la XOZ (688 mL/g), deduciéndose que cuando se aplica el aditivo, el ozono parece reaccionar de una forma más homogénea y selectiva. De XOA a XOAZ se disminuye el % GLC, lo que indica que estamos eliminando glucosa, pero debe ser celulosa de bajo peso molecular puesto que la viscosidad es superior en XOAZ que en XOZ. Por tanto, el aditivo podría evitar una degradación “descontrolada” del ozono,

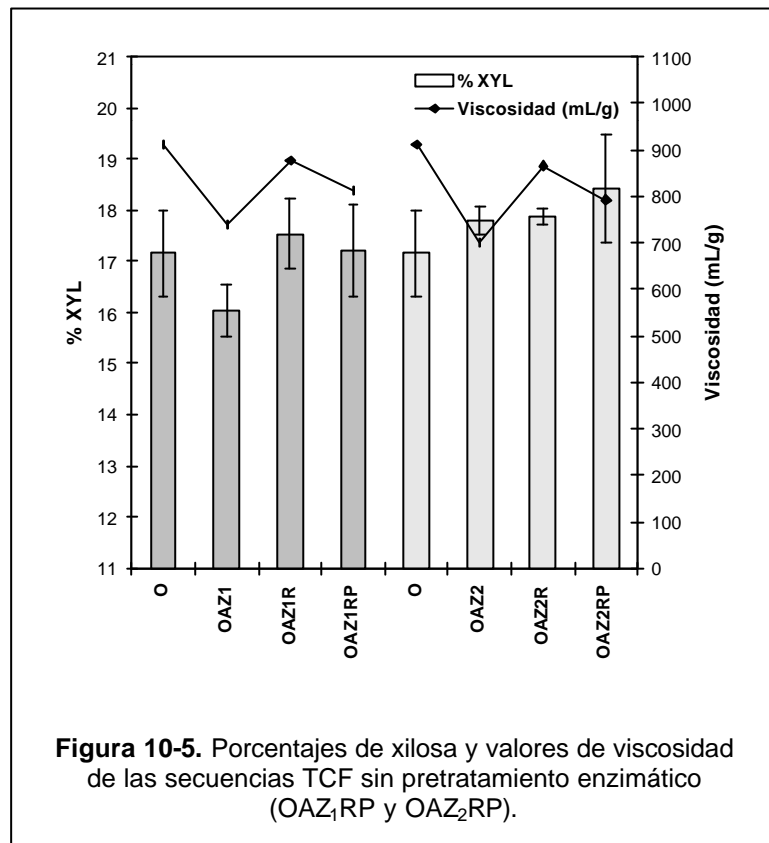
dirigiendo las reacciones del ozono hacia zonas más heterogéneas y de menor peso molecular, preservando las zonas más cristalinas y de mayor peso molecular.

Peróxido de hidrógeno: En cuanto a los resultados obtenidos después del estadio P (Figura 10-4) y comparando con la anterior etapa, se observa que no existe una variación significativa del porcentaje de xilosa en las secuencias sin aditivo (XOZP y XOZRP), sin embargo, en las secuencias con aditivo (XOAZP y XOAZRP) se produce una disminución lo que indica una disolución de hemicelulosas. No obstante, el valor final de XYL en estas últimas es superior a las anteriores, indicando que las pastas obtenidas de las secuencias con aditivo contienen una mayor cantidad final de xilanos. Aun siendo mayor el contenido de XYL, la viscosidad es también mayor, por lo que de nuevo se confirma que la aplicación de ácido oxálico previene la degradación masiva de la celulosa de mayor peso molecular y posiblemente más cristalina durante el blanqueo con ozono.

Postratamiento: Respecto a la realización del postratamiento con borohidruro sódico (Figura 10-4), no se evidencia un claro efecto, ya que los contenidos de xilosa son similares respecto a la etapa anterior (Z), advirtiéndose una ligera disminución en la pasta XOZR (14,4% XYL) en relación a la pasta XOAZR (15,6% XYL), por lo que puede decirse que su efecto parece depender de si se ha aplicado o no el aditivo durante el blanqueo con ozono. En el estudio de las propiedades del efluente realizado en el Capítulo 6, se observa que el postratamiento contribuye al valor de DQO en ambas secuencias XOAZRP (13,3 kg O₂/t pasta) y XOZRP (12,1 kg O₂/t de pasta). En la secuencia con aditivo (XOAZRP), esta materia orgánica contribuye en el color del efluente (1,4 kg Pt/t pasta), mientras que en la secuencia sin aditivo (XOZRP) la contribución en el color (0,4 kg Pt/t pasta) no es tan significativa. Esto induce a pensar que cuando se aplica el aditivo, durante el postratamiento se elimina lignina, que se corrobora con la disminución del índice kappa que tiene lugar en esta etapa R en la secuencia XOAZRP. Pero también podrían eliminarse grupos HexA que contribuyen al índice kappa y que son hemicelulosas, por lo que se reduciría el % XYL. No ocurre lo mismo cuando no se aplica el aditivo, pudiendo tener lugar una eliminación de hidratos de carbono, ya que tampoco se produce una disminución significativa del índice kappa. Estos hidratos de carbono podrían ser principalmente celulosa de bajo peso molecular, dando lugar a una disminución del % GLC.

Dosis de ozono, postratamiento y aditivo: En la Figura 10-5 se muestran los valores de contenidos en xilosa y de viscosidad de las secuencias TCF sin pretratamiento enzimático y con diferente dosis de ozono consumido. En esta figura podemos observar si el aditivo y el postratamiento siguen el mismo comportamiento que en el caso de las secuencias con pretratamiento enzimático. De nuevo, la aplicación de aditivo supone una disminución del contenido en xilosa del 14,3%, pasando del 17,2% XYL en O a 14,7% XYL en OA (Tabla 10-1), es decir, un 12,8% más que cuando se aplica el pretratamiento enzimático; mientras que el postratamiento mantiene la relación glucosa-xilosa. La

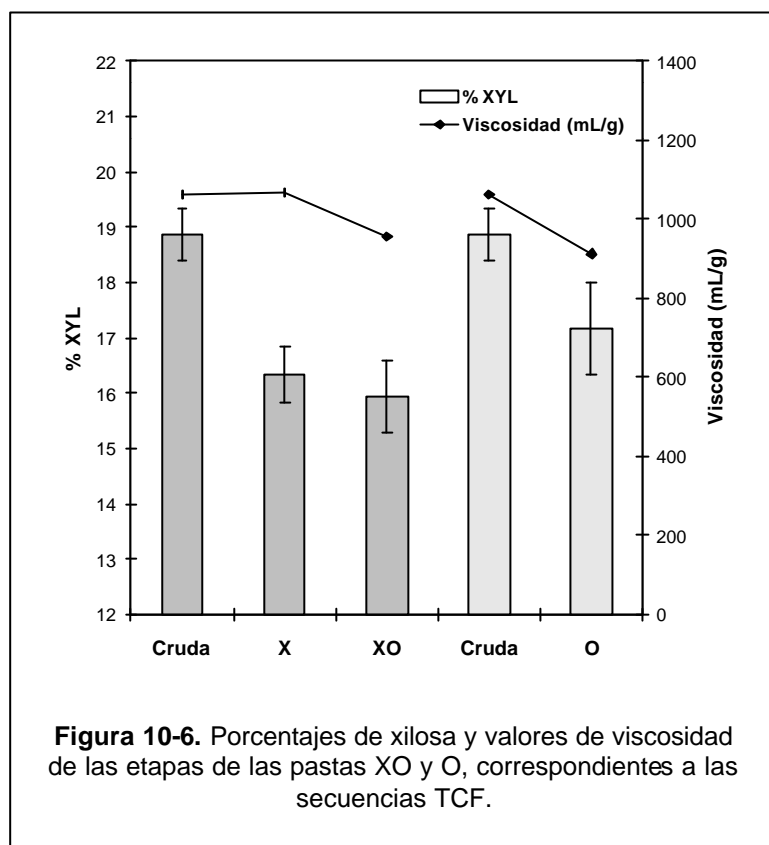
discrepancia reside en la etapa Z debido posiblemente a la diferente dosis de ozono aplicada. En la secuencia OAZ₁ (0,4% dosis ozono) se aumenta un 9,3% el contenido en xilosa, mientras que con OAZ₂ (0,55% dosis ozono) el incremento es del 21,1%, revelando que se ha producido una mayor eliminación de celulosa en esta última. Aunque al final llegamos a una misma viscosidad con ambas pastas, el contenido de xilosa es ligeramente mayor en la secuencia con mayor dosis de ozono, por lo que se deduce que se ha eliminado una mayor cantidad de celulosa de bajo peso molecular.



Efecto del tratamiento enzimático en una secuencia TCF y ECF.

TCF: Para observar el efecto de la aplicación de un tratamiento enzimático, se muestran en la Figura 10-6 la viscosidad y los contenidos en xilosa de XO (15,9% XYL) y O (17,2% XYL) de la pasta blanqueada según las secuencias TCF. El tratamiento O disminuye un 9,0% el contenido de xilosa respecto a la pasta cruda, mientras que el tratamiento XO reduce un 15,5% el contenido de xilosa, produciéndose la reducción principalmente (86,5%) en la etapa X. Así pues, aplicando el pretratamiento enzimático, se reduce un 42% más el contenido en xilosa, de manera que se corrobora que la xilanasa aplicada

actúa hidrolizando los xilanos presentes en la pasta. PHAM *et al.* (1995) también conseguían solubilizar alrededor del 16% de xilanos mediante un tratamiento con xilanasa, indicando que generalmente el grado de solubilización enzimática de xilanos no excede del 20% debido a la baja accesibilidad de los xilanos presentes en el material fibroso. Sin embargo, BUCHERT *et al.* (1996) conseguían solubilizar alrededor de un 30%.

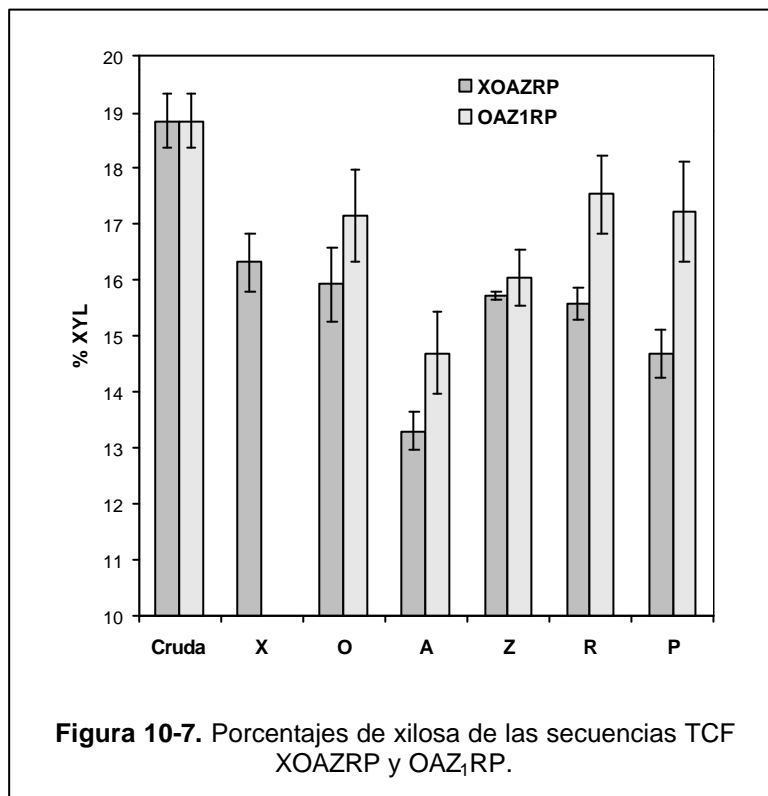


En el estadio X se observa un ligero incremento de la viscosidad. En el Capítulo 8 se comenta que este aumento de la viscosidad puede ser debido a una eliminación de hemicelulosas de bajo peso molecular, lo que se corrobora en el presente capítulo, puesto que los resultados muestran una gran disminución del porcentaje de xilosa. Además, esto también justifica la elevada DQO que se obtiene en esta etapa.

En este mismo Capítulo 8 se ha determinado el contenido en ácidos hexenurónicos (HexA), que se reduce durante el pretratamiento enzimático y la deslignificación con oxígeno. Como ya se ha comentado, estos ácidos HexA se hallan enlazados a los xilanos presentes en la pasta, y estos xilanos son parcialmente eliminados durante ambos

estadios, lo que explica la reducción del contenido en HexA, puesto que ni la enzima ni el oxígeno son capaces de reaccionar con los HexA.

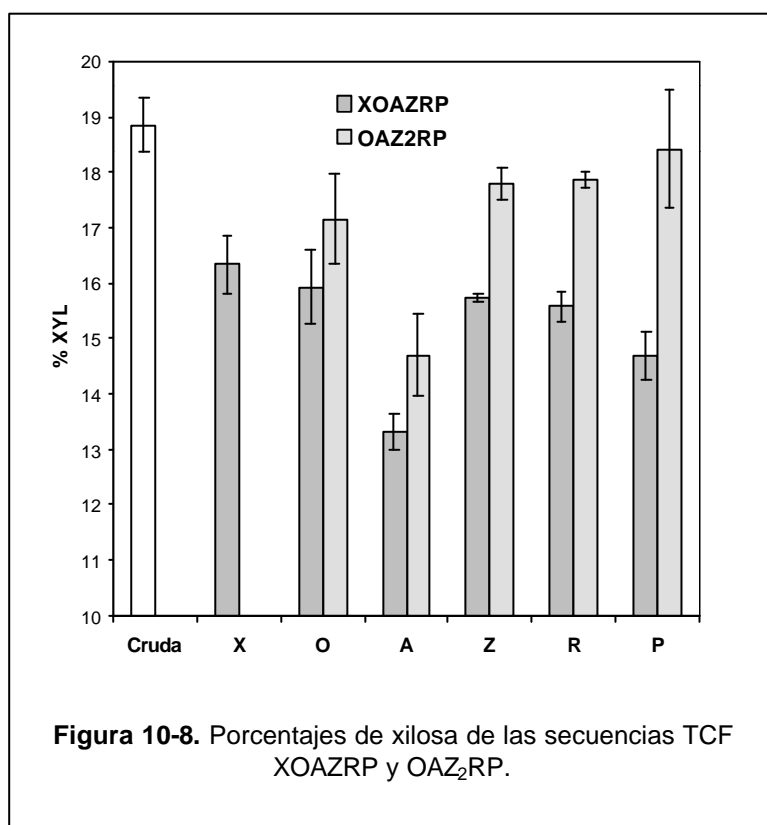
En la Figura 10-7 se muestra la secuencia TCF total, con y sin pretratamiento enzimático, e igualdad de condiciones de aplicación en las diferentes etapas de blanqueo, con una viscosidad final muy similar. Como puede observarse, la tendencia en las variaciones de XYL son similares en las dos secuencias XOAZRP y OAZ₁RP, excepto en la etapa R que en el caso de la XOAZRP se mantiene la relación, mientras que en OAZ₁RP, aumenta, deduciéndose una eliminación de glucosa. Pero, el valor de XYL es siempre inferior en todas las etapas de blanqueo en la pasta tratada con enzima que en la no tratada. La pasta final OAZ₁RP tiene un 8,6% menos de XYL respecto a la pasta cruda, y la XOAZRP tiene un 22,0% menos respecto a la pasta cruda, de manera que esta última pasta contiene un 14,7% menos de XYL respecto a la pasta OAZ₁RP, por lo que se observa que más o menos se conserva la variación de XYL que se obtenía después de la etapa O.



Por tanto, las secuencias XOAZRP y OAZ₁RP, que tienen una viscosidad final similar, se diferencian en el contenido en xilosa, siendo inferior en la pasta tratada con enzima. En el Capítulo 8, donde se estudian las propiedades físicas de las dos secuencias, se observa

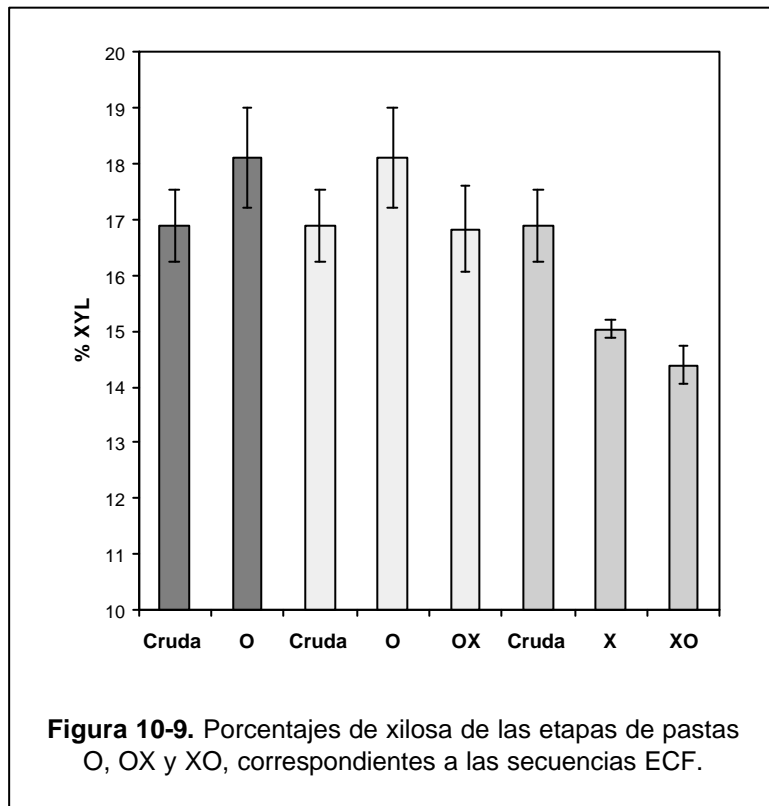
que éstas son muy similares entre ambas pastas, diferenciándose únicamente en el IRA y en el índice de desgarrado. El IRA es inferior en la pasta XOAZRP, y se comenta que puede ser debido a un menor contenido en xilosa, lo que se corrobora en el presente capítulo. Y en cuanto al índice de desgarrado, que es mayor en la pasta tratada con enzima, podría ser debido a una mayor facilidad de fibrilación externa debida a una disminución de los xilanos precipitados en la superficie de la fibra, que en un principio limitarían esta fibrilación. Este efecto podrá confirmarse en el Capítulo 11 mediante el estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM).

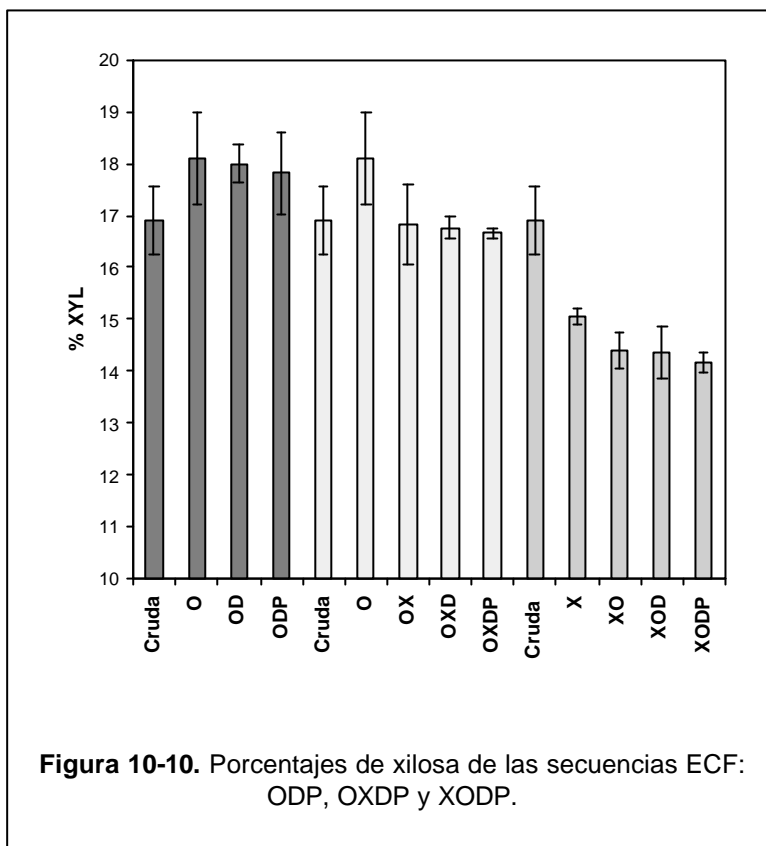
Las secuencias XOAZRP y OAZ₂RP se diferencian por el tratamiento enzimático y por la dosis de ozono, siendo un 27% mayor en la segunda; pero la viscosidad y la blancura final son similares. En la Figura 10-8 se muestran sus contenidos en xilosa, que son finalmente un 20% mayor en la secuencia sin enzima. De los resultados obtenidos, puede concluirse que la proporción de GLC-XYL no tiene ninguna influencia en la blancura final obtenida. Pero tal vez esta relación no tenga influencia en la blancura, pero sí en la estabilidad de la blancura. Según BUCHERT *et al.* (1996), las pastas blanqueadas con ozono o dióxido de cloro contienen menores cantidades de grupos carboxílicos debido a la degradación de grupos hexenurónicos (HexA), por lo que presentan mayor estabilidad a la blancura. Además, como se ha visto en el Capítulo 8, con un tratamiento enzimático también se eliminan grupos HexA, por lo que puede obtenerse una pasta con mayor estabilidad al envejecimiento.



Con la aplicación enzimática se consigue reducir la dosis de ozono necesaria, por lo que se degrada menos la celulosa y eso se observa en el mayor contenido de XYL en el caso de OAZ₂, aunque al final la viscosidad acaba siendo la misma, lo que también parece indicar que el ozono puede reaccionar preferentemente con la celulosa. Esto concuerda con los resultados obtenidos por PHAM *et al.* (1995).

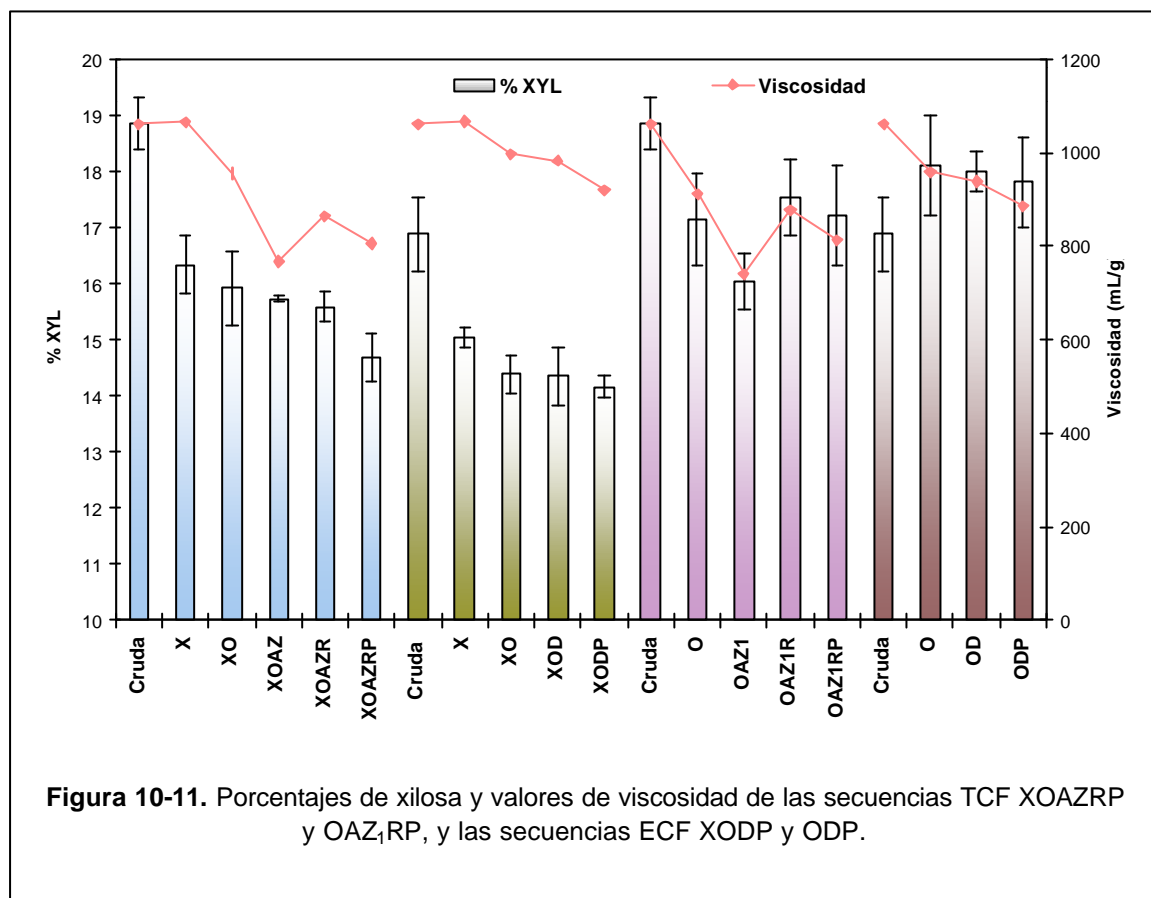
ECF: En la Figura 10-9 se muestran valores después de la deslignificación con oxígeno y con un tratamiento enzimático en dos posiciones diferentes dentro de la secuencia. En este caso se trata de una pasta de eucalipto diferente a la anterior y es en la que se habían realizado las secuencias ECF (ODP, OXDP y XODP), cuyos resultados de contenido de xilosa se muestran en la Figura 10-10. Como puede observarse en la Figura 10-9, el tratamiento enzimático siempre supone una reducción del contenido en xilosa, siendo del 7,0% en la pasta OX y del 14,8% en la pasta XO, por lo que, a nivel de eliminación de xilanos, es más efectivo situar el tratamiento enzimático antes de la deslignificación con oxígeno. En la Figura 10-10 se muestra la evolución del contenido de xilosa durante el blanqueo ECF, que no varía significativamente en las etapas de blanqueo con dióxido de cloro (D) y con peróxido de hidrógeno (P), manteniéndose la relación GLC/XYL obtenida después de la deslignificación con oxígeno y/o el tratamiento enzimático.





Comparación entre secuencias TCF y ECF. Efecto de los diferentes reactivos aplicados

En la Figura 10-11 se muestran los valores de xilosa y de viscosidad de las secuencias TCF (XOAZRP y OAZ₁RP), y de las secuencias ECF XODP y ODP. Aunque el blanqueo TCF se realiza sobre pasta de eucalipto con aproximadamente la misma viscosidad que la pasta cruda de las secuencias ECF, se observa que las primeras poseen un mayor porcentaje inicial de xilosa (10,4%). Pero aun así, los comportamientos de las etapas de blanqueo son muy similares. La mayoría de etapas de blanqueo suponen una disminución más o menos importante del contenido de xilosa, cuando se realiza un pretratamiento enzimático. No ocurre lo mismo cuando no se aplica X. Pero en general, puede concluirse que el contenido de xilosa disminuye conforme las pastas son blanqueadas, ya sea mediante una secuencia TCF o bien ECF, llegando al final de la secuencia a un contenido menor de XYL respecto a la pasta inicial, alcanzándose un mínimo de 14,2% XYL.



CONCLUSIÓN

En el presente capítulo se ha cuantificado el contenido de hidratos de carbono de diferentes pastas blanqueadas mediante secuencias TCF y ECF, con y sin pretratamiento enzimático.

La columna utilizada para la separación de azúcares por HPLC ha sido una AMINEX HPX-87P, y las condiciones de operación: agua para la fase móvil (eluyente), 0,6 mL/min de caudal, 85°C de temperatura y 30 bar de presión. Para el análisis cuantitativo de los monosacáridos se ha empleado el método de patrón interno, utilizando el inositol. Y en cuanto al método de hidrólisis de la muestra, se ha optado finalmente al ácido sulfúrico y la metodología se presenta descrita en el texto.

Los datos de contenido en azúcares de las pastas analizadas permiten efectuar un estudio del efecto de la aplicación o no del tratamiento enzimático, del aditivo y del postratamiento, de la dosis de ozono y agentes de blanqueo, y además comparar las secuencias TCF y ECF.

La aplicación del aditivo supone una disminución del porcentaje de xilosa (XYL), debido muy probablemente a una disolución de hemicelulosas fáciles de solubilizar en medio ácido, y esto se traduce en una contribución a la DQO del efluente. Pero después, durante el blanqueo con ozono, se produce una disminución de glucosa (GLC), por lo que se deduce que el aditivo podría evitar una degradación “descontrolada” por parte del ozono, preservando las zonas más cristalinas y de mayor peso molecular. Finalmente, las pastas blanqueadas con aditivo presentan una cantidad mayor de contenido en XYL.

En cuanto a la aplicación del borohidruro sódico, puede decirse que su efecto parece depender de si se ha aplicado o no el aditivo durante el blanqueo con ozono.

La mayor dosis de ozono supone una mayor eliminación del contenido en glucosa, ya que después del blanqueo con ozono el porcentaje en XYL es siempre superior, aumentando cuanto mayor es la dosis de ozono, por lo que parece que el ozono reacciona preferentemente con la celulosa de bajo peso molecular puesto que la viscosidad se mantiene

En cuanto al pretratamiento enzimático, se observa que se produce una reducción del 13,4% en el contenido de XYL, y junto con la deslignificación con oxígeno (pasta-XO) un 15,5%, corroborando pues, que la xilanasas utilizada como enzima produce la hidrólisis de xilanos. Esta hidrólisis es más efectiva cuando se aplica antes de la deslignificación con oxígeno que después. La pasta final XOAZRP contiene un 14,7% menos de XYL que la OAZRP, lo que puede perfectamente justificar que teniendo similares viscosidades, la pasta XOAZRP tiene menor IRA y mayor índice de desgarrado (Capítulo 8).

La relación GLC-XYL no parece tener una influencia directa en la blancura final obtenida, pero tal vez sí que podría influir en la estabilidad de blancura (envejecimiento).

En cuanto a la comparación entre secuencias TCF y ECF, puede concluirse que, en general, el contenido de xilosa disminuye conforme las pastas son blanqueadas, siguiendo comportamientos parecidos en ambos tipos de pastas, alcanzándose un mínimo de 14,2% XYL.

REFERENCIAS

- ACUÑA, L.; VILLAR, J.C. (1992). Análisis de azúcares elementales en pastas kraft y en pastas con polisulfuros. *Investigación y Técnica del Papel*, XXIX(113): 415-423.
- BORCHARDT, L.G.; EASTY, D.B. (1982). Improvements in the gas-chromatographic method for carbohydrates as alditol acetates. *Tappi*, 65(4): 127-128.
- BROWNING, B.L. (1967). *Methods of Wood Chemistry*. En: WILEY, J. (ed.). U.S.A.: Interscience Publishers.
- BUCHERT, J.; TELEMAN, A.; HARJUNPÄÄ, V.; TENKANEN, M.; MIKARI, L.; VUORINEN, T. (1995).

Effect of Cooking and Bleaching on the Structure of Xylan in Conventional Pine Kraft Pulp. *Tappi Journal*, 78(11): 125-130.

- BUCHERT, J.; TENKANEN, M.; EK, M.; TELEMAN, A.; VIKARI, L.; VUORINEN, T. (1996). Effects of Pulping and Bleaching on Pulp Carbohydrates and Technical Properties. *International Pulp Bleaching Conference*, Washington, D.C., USA, Proceedings, Book 1, p. 39-42.
- FUHRMANN, A.; MALINEN, R.; RAUTONEN, R.; ÁHUSALO, T.; SÁGFROS, P-E. (1995). Influence of ozonation parameters on delignification and cellulose degradation. *The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Helsinki, Finland, Vol I, p. 337-344.
- GUGGENBERGER, G.; CHRISTENSEN, B.T.; ZECH, W. (1994). Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. Lignin and carbohydrate signature. *European Journal of Soil Science*, 45(4): 449-458.
- HAUSALO, T. (1995). Analysis of Wood and Pulp Carbohydrates by Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Helsinki, Finland, Vol. III, p.131-136.
- MCDONALD, K. L.; GARBY, A.C. (1983). Gas Chromatography for Carbohydrates. *Tappi Journal*, 66 (2).
- NAVAS, A.; COLOM, J.F. (1980). Teneur en hémicelluloses des pâtes. Influence de l'extraction alcaline. *Revue A.T.I.P.*, 34 (2): 67-80.
- 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.
- RYDLUND, A.; DAHLMAN, O. (1995). Analysis of Wood-derived Oligosaccharides Using Capillary Electrophoresis. *The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Helsinki, Finland, Vol. III, p.159-164.
- SCHIMLECK, L.R.; WRIGHT, P.J.; MCHILL, H.J.; WALLIS, A.F.A. (1997). Near-infrared spectra and chemical composition of *E. globulus* and *E. nitens* plantation woods. *Appita Journal*, 50(1): 40-46.
- SJÖBERG, J.; DAHLMAN, O. (2000). Characterization of carbohydrates on kraft fiber surfaces. *Sixth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Bordeaux, France, Poster Presentations, p. 583-586.
- TELEMAN, A.; HAUSALO, T.; TENKANEN, M.; VUORINEN, T. (1995). Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid by NMR spectroscopy. *The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Helsinki, Finland, Vol. III, p. 109-114.
- TENKANEN, M.; HAUSALO, T.; SIIKA-AKO, M.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. (1995). "Use of Enzymes in Combination with Anion Exchange Chromatography in the Analysis of Carbohydrate Composition of Kraft Pulps. *The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Helsinki, Finland, Vol III, p.189-194.

VIDAL, T. (1982). *Influencia del sistema cloro-dióxido de cloro en la primera fase de blanqueo sobre los hidratos de carbono en pastas de Eucalyptus globulus*. Tesis doctoral, Facultad de Química, Universidad de Barcelona.

VIDAL, T.; COLOM, J.F. (1984). Determination of carbohydrates as alditol acetates by gas chromatography. *Tappi*, 67(9): 132.