

RECYT

Año 18 / N° 26 / 2016 / 16–20

Disgregado para microscopía de tejidos leñosos utilizando monoetanolamina en medio alcalino

Maceration for wood tissue microscopy, using monoethanolamine in alkaline medium

Carlos Eduardo Núñez¹

1- PROCYP, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552 (3300) Posadas, Provincia de Misiones, Argentina. Teléfono y Fax 52 0376 4422198.

* E-mail: cenunez@arnet.com.ar o contacto@cenunez.com.ar

Resumen

Este trabajo se fundamenta en la necesidad de contar con un método de disgregado de material fibroso lignocelulósico para microscopía, que no dañe demasiado las células y que se pueda realizar en el laboratorio en un tiempo corto, a presión atmosférica y sin sustancias tóxicas. Se desarrolló un procedimiento que consiste en tratar la madera con hidróxido de sodio en monoetanolamina a 170° C entre 1 y 4 horas. Se pudieron disgregar maderas diversas, tanto coníferas como latifoliadas. La cantidad de álcalis utilizado fue del 25% sms. con una relación licor – madera de 10. Un recuento de las fibras entre un 4 y un 5% de elementos rotos. Se halló una relación directa entre densidad de la madera y el tiempo necesario del tratamiento, siendo de 1 hora para la densidad de 0,14 Kg/dm³ y de 4 horas para la densidad 0,80 Kg/dm³.

Palabras clave: Disgregado, microscopía de fibras celulósicas, preparación de la muestra, etanolamina, pulpado químico.

Abstract

This work is based on the need to have a method for the isolation of lignocellulosic fibrous material for microscopy, without damaging the cells so much, which can be carried out in a short time in the laboratory, at atmospheric pressure, and without toxic. A procedure which consists of treating wood with sodium hydroxide into monoethanolamine at 170° C for 1 to 4 hours was developed. A variety of woods could be isolated- softwoods as well as hardwoods. The amount of alkali used was 25% on dry wood, with a liquor-wood relationship of 10. A quantitative analysis of fibers gave as a result between 4 and 5% of broken elements. A direct relationship between wood density and the time required to complete the treatment was found, being of 1 hour for the 0.14 Kg/dm³ density, and of 4 hours for the 0.80 Kg/dm³ density.

Key words: maceration, cellulosic fiber microscopy, sample preparation, ethanolamine, chemical pulping.

Introducción

El interés por la realización de este trabajo parte de la necesidad de conseguir un método de disgregado de materiales leñosos para su análisis microscópico que sea relativamente sencillo, rápido y que no use sustancias peligrosas para el trabajo en la mesada del laboratorio. El método utilizado frecuentemente es el de Franklin (1), que recurre a una mezcla de peróxido de hidrógeno concentrado y ácido acético puro a ebullición. Con el mismo se consigue disgregar el material lignocelulósico en dos o tres horas, pero esa misma rapidez lo hace incontrolable en la oxidación del material, generando una considerable cantidad de elementos dañados, células sin la pared primaria difíciles de teñir, y muchas fibras rotas. Es por eso que

el autor con C. Pavlik desarrollaron otro método (2)(3), que usa dióxido de cloro en medio acético a temperatura ambiente, seguido de un tratamiento con solución hirviendo de carbonato de sodio, que da excelentes resultados eliminando los problemas del de Franklin, pero que sin embargo requiere de varios días de reacción. Hay dos formas de disgregar por métodos químicos los materiales lignocelulósicos por deslignificación. Uno de ellos, que se usa para los análisis microscópicos, utiliza la propiedad de la lignina de ser más fácilmente oxidable que los polisacáridos y trabajan en consecuencia con oxidantes como el peróxido de hidrógeno o el dióxido de cloro. El otro que es el usado en los procesos industriales de pulpado, consiste en una hidrólisis térmica selectiva de la lignina y en el pasaje de los fragmentos obtenidos a la fase líquida

ya sea agregándole funciones solubles en agua o haciendo un medio acuoso en que los mismos se disuelvan. El sulfito usa el primero y el kraft el segundo.

Para realizar esto en la mesada es conveniente trabajar a presión atmosférica por lo que se pensó usar líquidos de alto punto de ebullición que parecieran afines para la hidrólisis térmica de la lignina, eligiendo, entre los comunes en el laboratorio el etilenglicol, 1,2- etanodiol de punto de ebullición 196° y la monoetanolamina, 2-aminoetanol de punto de ebullición 170°. Las pruebas de disgregado realizadas sobre prismas de madera dieron resultados aceptables, en el sentido que la madera se ablandaba y disgregaba parcialmente, pero sin llegar al estado necesario para los estudios microscópicos. Como de los dos líquidos la etanolamina fue la que mejor funcionó se decidió inicialmente tratar de mejorar el método utilizando esta sustancia.

La monoetanolamina es un líquido a temperatura ambiente, de función doble amina y alcohol, y por lo tanto polar y afín al agua, en la que es miscible. Posee un punto de ebullición de 170° C que es la temperatura de trabajo de proceso kraft, y una baja toxicidad para las cantidades y tiempos utilizados en el trabajo de laboratorio.

Fue utilizada desde los años 30 del siglo XX por Louis Wise et al. como agente deslignificante de tejidos leñosos (4). Si bien no se especifica el motivo de su elección, es probable que haya sido por su carácter doble de alcohol y amina, que la hace buen disolvente de la lignina, y le confiere considerable reactividad. En épocas posteriores se probó su uso en diversos procesos de pulpado generalmente disuelta con agua y a presión mayor que la atmosférica (5)(6). Una reseña de estos procesos se halla en un trabajo de Esa Muurinen del año 2000 (7).

Otras pruebas con monoetanolamina sola variando la cantidad de madera y el tiempo de tratamiento no mejoraron los resultados. Por ello se decidió agregar un coadyuvante de la deslignificación como es un álcali fuerte, es decir en este caso hidróxido de sodio que mejoró ostensiblemente el disgregado. Después de algunos ensayos se eligió una concentración de 25% sobre madera, que es la que utilizan los procesos industriales de pulpado. Es decir que resumiendo, se llegó a unas condiciones similares a la de un pulpado industrial a la soda aunque con un solvente diferente que posee algunas propiedades semejantes al agua, y a presión atmosférica.

Materiales y métodos

Se utilizó como materia prima lignocelulósica para la prueba del método las especies de coníferas y latifoliadas que se muestran en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1: Lista de especies de madera utilizadas en los disgregados

Nombre común	Nombre sistemático	Origen	Densidad seca aprox.
Madera de Balsa	<i>Ocroma pyramidale</i>	Listones comerc.	0,14
-	<i>Pinus taedai</i>	Rodajas	0,40
Sauce Llorón	<i>Salix babilónica</i>	Rodajas	0,40
-	<i>Eucalyptus grandis</i>	Rodajas	0,52
-	<i>Eucalyptus saligna</i>	Rodajas	0,58
Anchico Blanco	<i>Albizia Hassleri</i>	Tabla del duramen	0,69
Incienso	<i>Myrocarpus frondosus</i>	Tabla de duramen	0,80
Anchico colorado	<i>Piptadenia rigida</i>	Tabla de duramen	0,95

De ellas se usaron rodajas secas al aire de aproximadamente 2 cm de espesor de las que se extrajeron sectores circulares, y en el caso de las tablas se cortaron transversalmente franjas de aproximadamente 2 cm de ancho que, en ambos casos, se fraccionaron en prismas rajados en sentido de las fibras con una herramienta cortante, que inicialmente tenían entre 4 x 7 x 20 mm espesor, ancho y longitud y que en el transcurso del trabajo se redujeron de tal manera de tener dimensiones del orden de 3 x 3 x 20 mm.

Se utilizó etanolamina pro analysis por la importancia del punto de ebullición, aunque se podría usar grado puro mientras hierva por encima de 167° C. Dado que es higroscópica hay que tener la precaución de asegurarse de que no haya absorbido agua del ambiente, porque el punto de ebullición baja considerablemente por este motivo. El hidróxido de sodio utilizado también fue pro analysis. Se trabajó hirviendo en un balón a reflujo por el tiempo estipulado para cada experiencia. No se controló el tiempo desde el inicio hasta el momento de ebullición porque fue de pocos minutos, es decir que no se efectuó una impregnación previa de los prismas de madera.

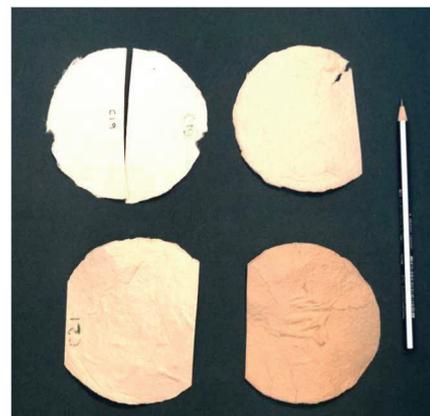


Figura N° 1: Hojitas de mano de los disgregados.

Una vez terminado el tratamiento se sacaron los prismas, se le escurrió el licor residual y se colocaron en un vaso con un agitador de laboratorio hasta alcanzar el máximo nivel de disgregado. Posteriormente se colocó el material en un embudo con tela metálica de 200 mesh y se lavó hasta que el pH del efluente fuera el mismo que el del agua de lavado. Posteriormente se confeccionó una hoja manual, Figura N° 1, se prensó entre secantes y se secó en estufa a 50° C. El material seco se pesó tal cual, se extrajo

una alícuota para el estudio microscópico y se calculó la sequedad secando a 110° C. Con ello se determinó el rendimiento de la operación.

Para la estimación del porcentual de fibras rotas se siguió el siguiente procedimiento. En una observación previa de los slides por el método con dióxido de cloro se observó que en general los elementos fibrosos estaban enteros y que los pocos fragmentos existentes se podían asimilar a mitades y tercios de fibras (2). De esta manera se fueron sumando las fracciones halladas para determinar el número de fibras rotas, de acuerdo con la expresión:

$$F = \frac{\text{nº de fibras enteras}}{(\text{nº mitades} \times 0,5 + \text{nº de tercios} \times 0,3) + \text{nº de fibras enteras}}$$

% de fibras enteras = F x 100

Para poder comparar los resultados de los diferentes tratamientos se confeccionó una tabla cualitativa que considera siete niveles desde la disgregación total hasta un estado de haber llegado solamente a impregnar los prismas que mantiene con la consistencia de la madera, Tabla N° 2. Entre ellos se consideró que los que iban a servir para el análisis microscópicos eran solamente los niveles 6 y 7. Estos niveles son los que se utilizan en la última columna de la Tabla N° 3.

Tabla N° 2: Niveles de alcance del proceso de disgregado

Nivel	Descripción
7	Material completamente disgregado
6	Disgregado con algunas pocas astillas blandas de pequeño tamaño
5	Disgregado con astillas no muy blandas
4	Parcialmente disgregado con muchas astillas no muy blandas
3	Prismas algo blandos disgregables parcialmente con trabajo mecánico
2	Solamente prismas ablandados
1	Prismas duros impregnados

Resultados y discusión

1.- Experiencias de disgregado

Se realizaron diversas experiencias de disgregado, Tabla N° 3, variando la especie de madera y el tiempo de tratamiento. Después de los ensayos previos las condiciones quedaron de la siguiente manera: relación volumen de licor a peso de madera: 10; relación de hidróxido de sodio a madera: 25% y temperatura de ebullición mayor de 168° C. Habitualmente se utilizaron 5 gramos de madera, 50 mL de etanolamina y 1,25 g de NaOH.

Tabla N° 3: Resultados de las experiencias de disgregado

Nombre común	Nombre sistemático	Densidad seca aprox.	Tiempo de trat. en hs.	Nivel de disgregado
Madera de Balsa	Ocroma pyramidale	0,14	1	7
-	Pinus taeda	0,40	4	7
-	Pinus taeda	0,40	3	7
-	Pinus taeda	0,40	2,5	6
Sauce Llorón	Salix babilónica	0,40	2	6
-	Eucalyptus grandis	0,52	3	7
-	Eucalyptus saligna	0,58	2,5	7
-	Eucalyptus saligna	0,58	2	5
Anchico Blanco	Albizzia Hassleri	0,69	4	5
Inciense	Myrocarpus frondosus	0,80	4	7
Anchico colorado	Piptadenia rigida	0,95	4	6
Anchico colorado	Piptadenia rigida	0,95	3	5
Anchico Colorado	Piptadenia rigida	0,95	1 - 3P	6

Referencia a tabla N° 3 : P significa una hora de impregnación a 80-110 °C y 3 horas hirviendo

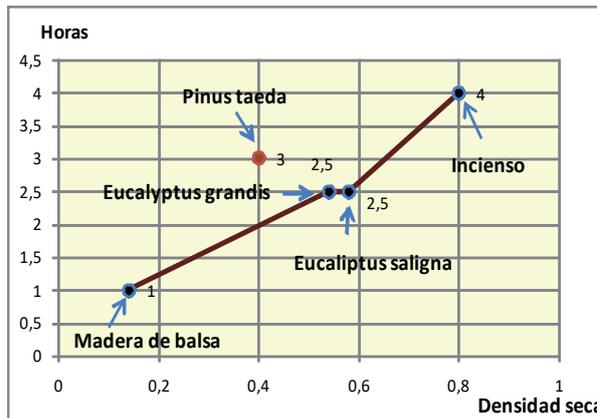


Figura N° 2: Tiempo para llegar al nivel 7 de disgregado en función de la densidad.

Se puede observar que existe una cierta relación inversamente proporcional entre densidad y facilidad de disgregado, Figura N° 2. Así la madera de balsa llega a nivel 7 con solamente una hora y el Pinus taeda y el Eucalyptus saligna en 2,5 horas. Las maderas con densidades mayores necesitaron 4 horas o más para llegar a nivel 6, o 7 en el caso del inciense. Tanto en el método del clorito - carbonato como en el que se está estudiando es frecuente que queden algunas astillas duras en una masa de fibras bien disgregadas, es decir que no hay material en diverso estado de disgregación como debiera haber si fuera el caso de falta de tiempo de reacción. Es por ello que se supone que se debe a una mala impregnación. En el método dióxido de cloro - carbonato, además, se ha visto que las astillas duras residuales disminuyen a medida que se aumenta el tiempo de saturación de los prismas con agua. La circunstancia de que el método de la etanolamina se haya desarrollado con tiempos tan cortos, sin etapa de impregnación, hace pensar que aquí también este pueda ser el caso.

2- Estado de las fibras disgregadas

Las figuras 3 a 6 representan ejemplos del estado de las fibras con el método de la monoetanolamina alcalina y de los otros procesos citados para comparación. La observación de las fibras disgregadas indicó que para las coníferas las mayoría de las traqueidas estaban enteras, y en las medidas estimativas realizadas, Tabla N° 4, se ve que solamente entre un 4 y un 5% se hallaban rotas. Este número es considerablemente superior al del método dióxido de cloro - carbonato que resultó con solamente un 0,2% de rotura (2). En la misma tabla se puede observar para comparación las traqueidas enteras halladas con los métodos de disgregado de Franklin y de dióxido de cloro - carbonato.



Figura N° 3: Fibras de *P. elliotii* tratadas por el método de dióxido de cloro - carbonato

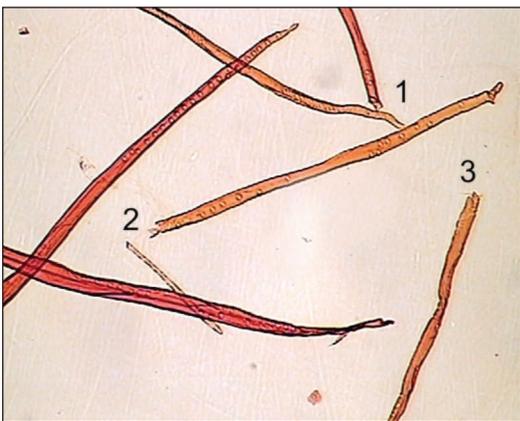


Figura N° 4: Fibras de *P. elliotii* tratadas por el método de Franklin. Los números indican roturas.



Figura N° 5: Fibras de *P. elliotii* tratadas con monoetanolamina alcalina.



Figura N° 6: Fibras de *Eucalyptus grandis* tratadas con monoetanolamina alcalina.

Desde este punto de vista el disgregado a la monoetanolamina se halla en un punto intermedio entre ellos, aunque más cercano al del dióxido de cloro - carbonato, con un número de roturas que no es significativo en el caso de su uso para mediciones de longitud.

Tabla N° 4: Estimación del porcentual de fibras rotas por el tratamiento con monoetanolamina alcalina.

Material	Horas de tratam.	N° de lecturas	% de fibras enteras
Pinus elliotii	4	463	96
Pinus elliotii	3	345	95
Inciense	4	456	99
Madera de Balsa	1	469	99
Anchico Colorado	4	458	100
Pinus elliotii Franklin P		892	81
Pinus elliotii ClO2 - C PP		1081	99,8

Notas: P Rotura de fibras con el método de Franklin; ácido acético - peróxido de hidrógeno para comparación, medido para este trabajo. PP Rotura de fibra con el método dióxido de cloro - carbonato de sodio para comparación, tomados de (2).

Conclusiones

Tratando madera cortada en fragmentos con etanolamina a ebullición, adicionada con 25% de hidróxido de sodio referido al peso de madera, entre una y cuatro horas según la especie, se consigue disgregar los elementos celulares

para su uso en el análisis microscópico manteniendo entre el 95 y el 100% de las fibras enteras.

La facilidad del disgregado completo es inversamente proporcional a la densidad de la especie tratada. No se pudo llegar al disgregado completo del Anchico Colorado, una especie muy densa y cargada de taninos en cuatro horas, aún utilizando una hora para impregnar.

Comparando estos resultados con los de otros métodos, el de la monoetanolamina alcalina resulta intermedio entre el de Franklin y el del dióxido de cloro - carbonato, en cuanto a la rotura de fibras, aunque mucho más cercano a este último, dado que para traqueidas llega a un 95 -96% de fibras enteras contra 81% del de Franklin y 99,8 el del dióxido de cloro - carbonato.

Referencias

1. Franklin G. L. *Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood*. Nature 155, p 51-59 (1945).
2. Núñez, C. E.; Pavlik, C. A. *Disgregado de tejidos leñosos por el método clorito – ácido acético – carbonato*. Evaluación del daño producido a las fibras. Rev. Cienc. Tecnol. 2 2. p 33 - 37 (1999).
3. Núñez, C. E. *Método de disgregado de material lignocelulósico con dióxido de cloro y carbonato de sodio*. El Papel. N° 173. p 42 - 45. (2013).
4. Wise, L. E., Peterson, F. C., and Harlow, W. M. *The Action of Ethanolamine on Woody Tissue*. Ind. Eng. Chem. Anal. Edit., 11, 1939. 18-19.
5. Claus, I, Kordsachia, O., Schröder, N., Karstens, T. *Monoethanolamine (MEA) pulping of beech and spruce wood for production of dissolving pulp*. Holzforschung. 58 6 p. 573–580, (2005).
6. Flandez, J., Pèlach, M. A., Tijero J., Vilaseca, F., Llop, M., Mutje, P. *Aptitude of Cellulosic Fibres from Whole Corn Stalks*. XXI TECNICELPA Conference and Exhibition / VI CIADICYP 2010. 12-15 October 2010, Lisbon, Portugal.
7. Muurinen, Esa. *Organosolv Pulping*. A review and distillation study related to peroxyacid pulping. Academic Dissertation. Faculty of Technology, University of Oulu. Linnanmaa, on June 30th, 2000.
8. www.herkules.oulu.fi/isbn9514256611/isbn9514256611.pdf - octubre de 2013.

Recibido: 26/10/14

Aprobado: 12/11/15