DIMENSÕES TRANSVERSAIS DE FIBRAS DE PASTAS KRAFT DE *E. GLOBULUS* DETERMINADAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Paulo J. Ferreira[1], M. Helena Vaz[2], M. Norberto Sousa[3] e M. Margarida Figueiredo[4]

RESUMO

Este trabalho faz parte de um estudo mais amplo que envolve a determinação das dimensões transversais de fibras de *E. globulus* em pastas *kraft* obtidas em diferentes condições de cozimento. Em particular, neste caso é estudada a aplicabilidade da técnica de microscopia confocal (CLSM - *Confocal Laser Scanning Microscopy*), uma técnica recente que permite medições rápidas que não danificam a estrutura das fibras, confrontando os resultados de fibras de uma pasta produzida em condições laboratoriais específicas com os facultados por microscopia óptica convencional. Adicionalmente, é medida a espessura da parede das fibras na madeira com recurso a esta última técnica e analisa-se a possibilidade de, com microscopia confocal, detectar as variações das dimensões transversais ocorridas durante a refinação.

Palavras Chave: *E. globulus*, microscopia confocal, espessura da parede, grau de colapsabilidade,.

INTRODUÇÃO

Como é amplamente reconhecido, as características morfológicas das fibras influenciam de modo determinante as propriedades do produto final e sofrem também alterações significativas durante a fabricação da pasta e do papel [(3)].

Em especial as dimensões transversais das fibras, nomeadamente a área e a espessura da parede, o perímetro externo e a área do lúmen, são variáveis tanto ou mais relevantes do que o comprimento, como reflecte o número crescente de estudos que se têm desenvolvido neste domínio[(6,8,10,12,15-17)]. Assim, por exemplo, o *coarseness* das fibras, mais do que relacionável com o comprimento destas, é simplesmente proporcional à área da secção recta da parede, sendo fibras *coarse* aquelas que apresentam maiores áreas. Contudo, como fibras com a mesma área da parede podem ter espessuras e perímetros muito diferentes, não só o *coarseness* como também as restantes dimensões transversais devem ser consideradas para avaliar a qualidade da pasta e do papel. Além disso, fibras com paredes de menor espessura são mais flexíveis

[1] Assistente; Dep. Eng. Química - Univ. de Coimbra; Tel: (039) 828392, Fax: (039) 841138
E-mail: pjtf@eq.uc.pt.
[2] Aluna finalista; Dep. Eng. Química - Univ.de Coimbra; Tel: (039) 828392, Fax: (039) 841138
[3] Aluno finalista; Dep. Eng. Química - Univ.de Coimbra; Tel: (039) 828392, Fax: (039) 841138
[4] Professora Associada com Agregação; Dep. Eng. Química - Univ. de Coimbra; Tel: (039) 828392, Fax: (039) 841138

e colapsam mais facilmente, o que favorece a sua conformabilidade e o estabelecimento de maior número de ligações nas folhas, tornando estas mais densas, mais macias e com maiores resistências mecânicas. As propriedades ópticas do papel, que dependem do arranjo espacial das fibras, são igualmente condicionadas pela área superficial das fibras, a qual é função da sua largura.

Vários têm sido os métodos utilizados para quantificar os parâmetros transversais das fibras. No caso da madeira, o processo é relativamente simples pois é fácil obter cortes micrométricos perpendiculares ao eixo das fibras, para depois, através de software adequado de análise de imagem, aceder às dimensões da fibra, do lúmen e da parede [6,12]. Já as medições em fibras de pasta são mais complexas, não só porque ao longo do processo – desde a madeira até ao papel – a estrutura destas é parcialmente danificada, envolvendo por exemplo a ruptura da parede ou até o colapso total do lúmen[6,7], como também porque é difícil e moroso obter secções transversais das fibras quando dissociadas da matriz lenhosa. No caso da espessura da parede uma alternativa é simplesmente calculá-la a partir do *coarseness*, da largura das fibras e da densidade da parede, assumindo que são cilíndricas[7]. Por outro lado, as projecções longitudinais das fibras em lâminas permitem estimar a espessura da parede a partir da largura da fibra e do lúmen[15] mas têm a desvantagem de considerar apenas um plano das fibras e não toda a secção, e de, por isso, também não facultarem a medição nem do perímetro nem da área da parede e do lúmen. Outra opção é a de seccionar transversalmente as fibras após a desidratação, o alinhamento, a inclusão em resina, o corte micrométrico, a coloração dos cortes e a fixação em lamelas[2,10]. O procedimento é obviamente moroso e elaborado, sendo além disso difícil assegurar que não danifica a parede das fibras e que os cortes efectuados são realmente perpendiculares ao eixo destas. De qualquer modo, as medições em secções rectas por microscopia convencional são condicionadas pela baixa resolução dos sistemas ópticos normais, o que suscitou o recurso à microscopia electrónica de varrimento (SEM) para obter microfotografias com maiores ampliações (até 750x)[9]. No entanto, o método é dispendioso, além de igualmente complexo e demorado, e, apesar de facilitar a observação tridimensional da estrutura fibrosa com níveis de resolução elevados, não permite contudo efectuar medições de forma não intrusiva.

As limitações referidas, especialmente ao nível da danificação das fibras durante a preparação das amostras, da complexidade e morosidade desta preparação e da obtenção de cortes perfeitamente transversais, conduziu à aplicação da microscopia confocal (CLSM - *Confocal Laser Scanning Microscopy*), inicialmente aplicada nos domínios da biologia e da medicina para estudo de sistemas vivos, à análise de fibras. Desde os trabalhos pioneiros[8] vários têm sido entretanto os estudos realizados quer em fibras quer em papel, dadas as vantagens desta técnica, que permite visualizar rapidamente, com procedimentos laboratoriais simples, cortes perfeitamente normais ao eixo das fibras a partir da sua simples deposição em lâminas ópticas, sem qualquer destruição da estrutura, facultando depois, com *software* de morfometria, valores das diferentes dimensões transversais[1,6-8,13,14,17,18]. O

princípio de funcionamento assenta na aquisição da luz reflectida proveniente de um único ponto no plano focal XY (desprezando-se todo o sinal emanado de pontos exteriores ao plano), no varrimento ao longo desse plano e, depois, ao longo de sucessivos planos de espessura limitada, na direcção Z, de modo a reconstruir tridimensionalmente o objecto observado.

Sendo significativo o número de publicações relacionadas com a aplicação da microscopia confocal ao estudo de fibras, não existem contudo trabalhos envolvendo o eucalipto *E. globulus* nacional, o que motivou o presente trabalho, no qual se utiliza esta técnica na medição de dimensões transversais de fibras desta espécie e se confrontam os resultados com os obtidos por microscopia óptica convencional em projecções longitudinais de fibras. O objectivo foi não só o de testar a aplicação da microscopia confocal mas também o de simultâneamente avaliar as suas potencialidades para detectar eventuais modificações da estrutura da parede das fibras ocorridas durante o seu processamento. Os resultados de pastas cruas foram ainda comparados com os resultados de medições efectuadas na madeira.

PARTE EXPERIMENTAL

Neste estudo foi utilizada uma rodela de madeira DAP proveniente de um clone de *E. globulus* com 10 anos de idade. Para as medições na madeira foram fervidos cinco pequenos provetes, correspondentes a diferentes posições radiais, nos quais se fizeram cortes de 15 µm na direcção transversal. Após coloração com verde de iodo e desidratação, os cortes foram fixados em lâminas e secos em estufa a 45ºC durante 24 horas. As análises efectuaram-se num microscópio óptico (modelo BH-2, da *Olympus*), ligado a uma câmara de vídeo CCD (Charge Coupled Device) e a um computador, o qual, com o software CUE-2, permitiu o processamento das imagens adquiridas. A ampliação usada correspondeu a 0,167x0,113 μm^2/pixel num monitor com 512x512 pixéis. A espessura da parede foi calculada a partir da distância entre os lúmens de duas fibras adjacentes, conforme se indica na Figura 1.

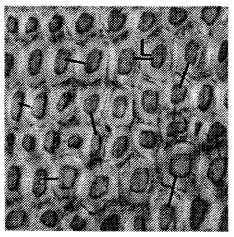

Figura 1 - Imagem microscópica de um corte histológico da madeira para medição da espessura da parede das fibras (L = 2 x espessura da parede)

Para as medições nos elementos dissociados cozeram-se pelo processo *kraft* aparas da fracção aceite da crivagem laboratorial num digestor descontínuo do tipo MK com circulação forçada de licor, usando-se 30% de índice de sulfureto, 15% de carga alcalina e uma temperatura de 170ºC durante 40 minutos. Da

pasta resultante, com 14,9 de IK, 1208 dm^3/kg de viscosidade e 15,9% de pentosanas, uma parte foi submetida a refinação laboratorial no refinador PFI a 10% de consistência, usando 2000 revoluções, tendo o ºSR aumentadode 28 para 49. Em ambas as pastas (não refinada e refinada) foram eliminados os finos, no Dynamic Drainage Jar (DDJ), usando a malha de 200 mesh. Para a análise no microscópio óptico as fibras foram depois coradas com violeta de genciana, lavadas, depositadas em lâminas com glicerina albuminada, e deixadas secar ao ar. As medições foram efectuadas num microscópio óptico (modelo Laborlux K, da *Leitz*), também acoplado a uma câmara de vídeo CCD e a um computador equipado com o software Quantimed 500C, usando-se uma ampliação de 0,23x0,23 μm^2/pixel num monitor com 512x512 pixéis. A espessura da parede foi calculada por diferença entre as larguras da fibra e do lúmen – tanto quanto possível na perpendicular ao seu eixo – medidas em três pontos da fibra: no centro e sensivelmente a meia distância entre este e cada uma das extremidades (Fig. 2). Considerou-se depois para cada fibra a média resultante das três leituras.

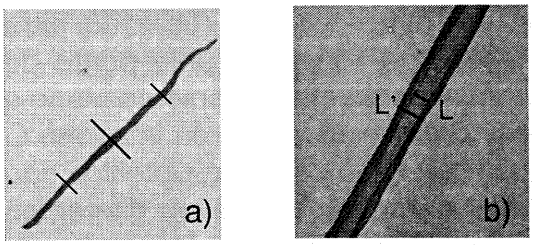

Figura 2 - Imagem do microscópio óptico de uma fibra de pasta *kraft* para medição da espessura da parede: a) três pontos da fibra nos quais se mede a largura da fibra e do lúmen; b) medição da largura da fibra e do lúmen num ponto (L' - L = 2 x espessura da parede).

Para as medições por microscopia confocal as fibras foram coradas com laranja de acridina (compatível com a banda de excitação do laser usado), de modo a tornarem-se suficientemente auto-fluorescentes e assim poderem gerar boas imagens operando no modo de epi-fluorescência, que melhor permite detectar pormenores do interior da amostra (no caso, do interior da parede). O excesso de corante foi removido e as fibras foram depositadas em lâminas ópticas, deixadas secar ao ar, e depois fixadas utilizando *Permount DPX*, com um índice de refracção próximo quer do das fibras quer do das lâminas e lamelas. A aquisição de imagens efectuou-se num microscópio de fluorescência normal (Nikon Optiphot 2) associado ao sistema Bio-Rad MRC-600, sendo a fonte de luz um laser de krypton-árgon com um comprimento de onda de 488 nm. O princípio de funcionamento da microscopia confocal está esquematicamente representado na Fig. 3 e é descrito em detalhe na literatura[1,8,14], pelo que será aqui referido apenas de modo simplificado.

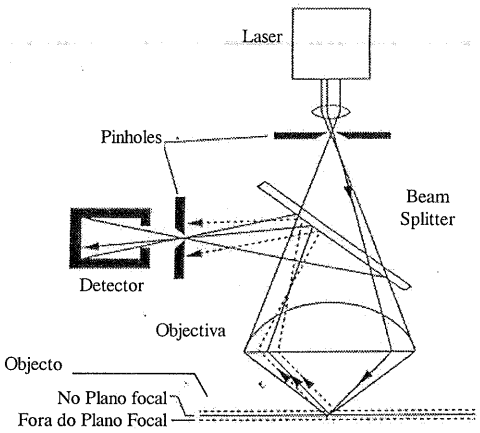

Figura 3 - O princípio da microscopia confocal[1].

O sistema inclui basicamente uma fonte de luz lase, um *pin-hole* (utilizado para iluminar um único ponto no plano focal), um *beam-splitter* que direcciona a luz reflectida pelo objecto para o fotodetector, um outro *pin-hole* (utilizado para limitar a luz que penetra no fotodetector apenas à reflectida pelo ponto do plano em foco), um sistema de varrimento da platina do microscópio no plano e em profundidade e uma unidade de aquisição e processamento da imagem. O *pin-hole* fonte, o ponto de iluminação do objecto e o *pin-hole* detector são confocais uns em relação aos outros, isto é, têm o mesmo foco em diferentes locais do percurso óptico. Deslocando o feixe de luz laser ao longo de um plano XY é gerada uma imagem do objecto ponto-a-ponto, com uma profundidade limitada pela abertura do *pin-hole* detector; deslocando depois verticalmente a placa do microscópio obtêm-se sucessivos planos do objecto, os quais, uma vez sobrepostos, permitem a sua reconstrução tridimensional (Fig. 4), e mesmo, com software adequado, a sua visualização segundo diversos ângulos e posições. Seleccionando na lâmina fibras orientadas perpendicularmente à direcção de varrimento no plano XY é possível, após a sobreposição dos diferentes planos obtidos em profundidade, definir pontos ao longo do comprimento das fibras em que se efectua o "corte" na vertical e se obtêm assim secções rectas perfeitamente normais ao seu eixo.

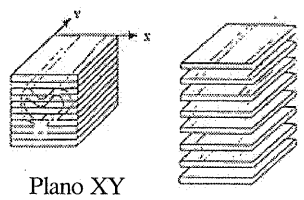

Figura 4 - Varrimento óptico do objecto no plano XY, por microscopia confocal, e sobreposição de sucessivos planos para reconstrução tridimensional da imagem.

No presente trabalho foi utilizada uma objectiva de imersão de óleo de 100x com uma abertura numérica de 1,3, o que corresponde a uma área de observação de 25x17 μm^2 com uma resolução de 0,146x0,146 μm^2/pixel no plano e também de 0,146 µm em profundidade. O passo de varrimento ao longo da espessura da fibra foi de 0,30 µm (valor próximo do dobro da resolução vertical). Para cada fibra foi reconstruída a secção transversal em três pontos distintos, como se indica na Fig. 2.

Uma vez adquiridas as imagens das secções rectas das fibras, procedeu-se ao seu tratamento morfométrico por meio do software CUE-2, o que envolveu a aplicação de filtros ópticos para melhoria dos contornos, o *threshold*, a binarização e a análise propriamente dita. Na Fig. 5 está representado um corte transversal de uma fibra e a correspondente imagem binarizada, cuja área da parede (A_w) e perímetro total (interno e externo, P_w) são automaticamente medidos pelo sistema. Este calcula depois o comprimento e a largura de um rectângulo com a mesma área e perímetro da imagem, podendo então considerar-se a espessura da parede equivalente à largura[4]. Por adequado processamento da imagem é também possível calcular o *aspect ratio* da fibra ou a área e largura do lúmen, e aceder assim a parâmetros como o índice de colapsabilidade ou o índice de flexibilidade[4,7,9]. Os valores da espessura da parede foram comparados com os obtidos por outros métodos de cálculo, baseados por exemplo na área da parede e no perímetro externo[9,17] ou no perímetro central da fibra[7,16], não sendo todavia os resultados apresentados neste texto.

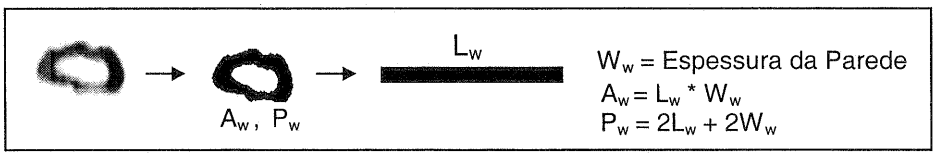

Figura 5 - Secção recta de uma fibra obtida no microscópio confocal e após binarização para medição da área e do perímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos cortes da madeira de cada um dos provetes realizaram-se medições em número suficiente para obter um valor médio da espessura da parede com um desvio não superior a 5%, com 95% de confiança. Na Tab. 1 são apresentados os resultados para cada um dos cinco provetes considerados, bem como a média ponderada, usando o raio como factor de ponderação.

Tabela 1 - Espessura média da parede das fibras na madeira (nível DAP).

Espessura da parede, $e \pm 0{,}05e$ (µm)					Média Ponderada, (µm)
Centro				Periferia	
1,86	1,96	2,14	2,45	2,79	2,41

Conforme se verifica, ocorre um aumento da espessura da parede das fibras na direcção radial, confirmando outros trabalhos[4], o que está provavelmente relacionado com o facto de as células do câmbio mais exteriores serem mais maduras.

Relativamente às medições efectuadas nas fibras de pasta não refinada e refinada analisaram-se em cada caso 50 fibras, quer por microscopia óptica convencional quer por microscopia confocal, actualizando-se o valor da média da espessura sempre que se analisava mais uma fibra. A evolução desta média, para cada uma das pastas, está representada na Fig. 6, verificando-se que rapidamente tende a estabilizar. O valor final da média, bem como a correspondente incerteza, com um grau de confiança de 95%, estão indicados na Tab. 2, confirmando-se que, para o número de fibras considerado, o desvio da média já é muito pequeno.

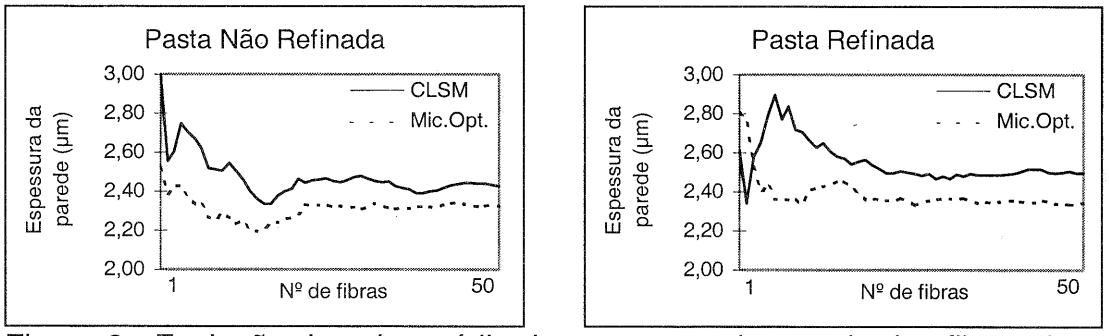

Figura 6 - Evolução do valor médio da espessura da parede das fibras de uma pasta *kraft* com o acréscimo do número de fibras analisadas, por microscopia confocal (CLSM) e por microscopia óptica covencional (Mic. Opt.).

Tabela 2 - Média da espessura da parede das fibras numa pasta *kraft**, antes e após a refinação (50 fibras).

Técnica	Espessura da Parede, $e \pm \Delta$** (µm)	
	Pasta Não Refinada	Pasta Refinada
CLSM	2,43±0,03	2,49±0,03
Mic. Óptica convencional	2,32±0,02	2,35±0,03

*IK = 14,9; viscosidade = 1208 dm^3/kg ; pentosanas = 15,9%
** Desvio com 95% de confiança

Por outro lado, no âmbito de um estudo mais vasto efectuado com fibras de várias pastas com diferentes características, foi possível verificar que, a partir de uma dada altura, por mais fibras que se analisem, não ocorre variação significativa na média, o que se exemplifica na Tab. 3 com os resultados de uma dessas pastas. Assim sendo, e como também os desvios obtidos são inferiores à incerteza dos métodos experimentais (e.g., a resolução vertical por CLSM é de 0,15 µm e o passo de 0,30 µm), admite-se como perfeitamente suficiente a análise de 50 fibras.

Tabela 3 - Evolução da média da espessura da parede das fibras de uma pasta *kraft* refinada*, com o acréscimo do número de fibras analisadas por microscopia confocal.

Espessura da Parede, $e \pm \Delta$** (μm)			
50 fibras	60 fibras	70 fibras	80 fibras
2,44±0,04	2,44±0,03	2,45±0,03	2,43±0,03

*IK = 14,5; viscosidade = 696 dm^3/kg ; pentosanas = 15%
** Desvio com 95% de confiança

No estudo realizado desprezaram-se fibras com uma espessura de parede inferior a 1,5 μm e superior a 3,5 μm (em número muito reduzido), bem como fibras com o lúmen total ou parcialmente colapsado (isto é, com pontos de contacto entre a parede). Para eliminar os erros associados à fadiga do operador o cálculo da média só se efectuou depois de distribuir aleatoriamente as fibras analisadas. Os resultados da Tab. 2 são comparáveis com os de outros trabalhos[2,11,17] mas inferiores aos obtidos pelos autores com o mesmo software em cortes micrométricos com inclusão de resina[5]. Os valores dados por CLSM são ligeiramente diferentes dos dados por microscopia óptica, apesar de ambos indiciarem um pequeno aumento da espessura da parede com a refinação. Todavia deve atender-se a que os erros experimentais das leituras efectuadas por microscopia óptica segundo a metodologia indicada na Fig. 2 são relevantes, quer porque a resolução do sistema é menor do que a de CLSM, sendo mais difícil distinguir a fronteira lúmen/parede, quer ainda porque o seccionamento da fibra dificilmente é perpendicular ao seu eixo. No caso da microscopia confocal há também que analisar os resultados tendo presente a incerteza associada ao passo do varrimento em profundidade e à selecção dos níveis de *threshold* na binarização da imagem. Os valores obtidos por microscopia convencional para as fibras da pasta não refinada podem comparar-se com os da madeira, uma vez que o princípio de medição é o mesmo, notando-se uma diminuição da espessura da parede com o cozimento (passando de 2,41 para 2,32).

O aumento da espessura da parede com a refinação está de acordo com as conclusões de outros autores, que sustentam que, pelo menos para baixas energias de refinação, ocorre uma delaminação parcial da parede da fibra, o que, associado à fibrilação interna, facilita a entrada de água[10,15]. Esta entrada faz aumentar a espessura da parede à custa de uma diminuição da área do lúmen, mantendo-se a área da parede praticamente inalterada (daí que o *coarseness* pouco varie), o que aliás foi também confirmado neste estudo (Tab. 4). Em pastas químicas, só para níveis de refinação mais elevados é que a fibrilação externa e o consequente *peeling* da fibra podem originar uma redução da espessura da parede[2]. A Tab. 4 revela ainda que o *aspect ratio* das fibras variou pouco com a refinação mas que, conforme o esperado, o índice de colapsabilidade aumentou, o que se reflecte numa redução acentuada da relação área do lúmen/área da fibra.

Tabela 4 - Variação de alguns parâmetros morfológicos das fibras de uma pasta *kraft** com a refinação (medições por microscopia confocal).

	Pasta Não Refinada	Pasta Refinada	Δ (%)
Área da parede (μm^2)	57,96	56,70	- 2,2
Aspect ratio da fibra	0,71	0,70	-1,4
Área do lúmen (μm^2)	21,92	17,75	-19,0
Índice de colapsabilidade	0,16	0,20	+25,0

*IK = 14,9; viscosidade = 1208 dm^3/kg ; pentosanas = 15,9%

Finalmente, comparando as pastas refinadas das tabelas 2 e 3, verifica-se que à de menor viscosidade corresponde a menor espessura da parede. Esta pasta, apesar de obtida com a mesma carga alcalina (15%), foi cozida a uma temperatura mais elevada durante mais tempo (181ºC e 90 min. *vs.* 170ºC e 40 min.), o que se pode ter reflectido na maior degradação da estrutura da parede com a consequente diminuição da sua espessura. A Tab. 3 reflecte ainda a uniformidade de valores da espessura da parede, superior à de outras *hardwoods* (bétula ou faia)[11].

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo aqui apresentado confirmam que a microscopia confocal é uma boa alternativa à análise de cortes histológicos por microscopia convencional na determinação das dimensões transversais das fibras, pois, por mera deposição destas em lâminas ópticas, permite efectuar as medições de modo muito mais simples e rápido, com menores erros experimentais e sem danificar a estrutura das fibras. Todavia, se o objectivo for o de apenas medir a espessura da parede e não aceder a outros parâmetros, como a área ou o perímetro da secção recta, a área do lúmen ou o grau de colapsabilidade, então a visualização directa das fibras em projecção longitudinal, no microscópio óptico, é suficiente para obter informação relativa à ordem de grandeza dessa espessura em vários pontos da fibra e às variações ocorridas no processo (nomeadamente durante a refinação). Com este trabalho verifica-se também que, em pastas cruas, a dispersão de valores da espessura média da parede das fibras é reduzida e que, com níveis de refinação moderados, ocorre um ligeiro aumento da espessura da parede, acompanhado de uma diminuição da área do lúmen e de um acréscimo do grau de colapsabilidade. Finalmente, os resultados obtidos indiciam que com o cozimento da madeira a espessura da parede das fibras diminui um pouco e que cozimentos a temperaturas mais elevadas originam fibras de parede um pouco mais fina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao RAÍZ - Instituto de Investigação da Floresta e Papel, e ao IBILI - Instituto Biomédico de Investigação da Luz e da Imagem, todo o apoio prestado na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Béland, M.C., Mangin, P.J., 1995, Three.dimensional evaluation of paper surfaces using confocal microscopy, in *Surface analysis of paper*, CRC Press Inc.
2. Brindley, C.L., Kibblewhite, R.P., 1996, Comparison of refining response of eucalypt and a mixed hardwood pulp and their blends with softwood, *Appita*, **49** (1), 37-42.
3. Clark, J.d'A., 1985, *Pulp technology and treatment for paper*, 2nd ed., Miller Freeman Publications Inc.
4. Downies, J.M., *et al.*, 1997, *Sampling plantation eucalypts for wood and fibre properties*, Csiro Publishing, 108.
5. Ferreira, P.J., Carvalho, M.G., Martins, A.A., Figueiredo, M.M., 1996, Caracterização dimensional de fibras de eucalipto, in Proc. *XV Encontro Tecnicelpa*, Aveiro, 208-218.
6. Hatvani, T., Evans, R., Kibblewhite, R.P., Parker, I., 1997, Effects of pulping and drying on fibre perimeter and wall thickness, Proc. *Appita'97*, 541-543.
7. Jang, H.F. , Amiri, R., Seth, R.S., Karnis, A., 1996, Fiber characterization using confocal microscopy-collapse behavior of mechanical pulp fibers, *Tappi Journal*, **79**, 203-210
8. Jang, H.F., Robertson, A.G., Seth, R.S., 1992, Transverse dimensions of wood pulp fibres by confocal laser scanning microscopy and image analysis, *Journal of Materials Science*, **27**, 6391-6400.
9. Johnsen, P.O., Gregersen, Ø.W., Berglie, S., Skinnarland, I., Borthen, B., Helle, T., 1997, Processing of the SEM micrographs of fibre sections and image analysis of the cross sections, *Nordpap Project Report*, Trondheim, 1-11.
10. Kibblewhite, R.P., Bailay, D.G., 1988, Measurement of fibre cross-section dimensions using image processing, *Appita*, **41**, 297-303.
11. Kibblewhite, R.P., Bawden, A.D., Hughes, M.C., Hardwood market kraft fibre and pulp qualities, *Appita*, **44** (5), 325-332.
12. Kibblewhite, R.P., Evans, R., Riddell, M.J.C., 1997, Handsheet property prediction from kraft-fibre and wood-tracheid properties in eleven radiata pine clones, *Appita*, **50** (2), 131-138.
13. Martinez-Nistal, A., Alonso, M., Gonzalez-Rio, F., Sampedro, A., Astorga, R., 1998, 3D Reconstruction of wood fibres using confocal microscopy, *European Microscopy and analysis*, January 1998, 23-24.
14. Moss, P.A., Retulainen, E., Paulapuro, H., Aaltonen, P., 1993, Taking a new look at pulp and paper: applications of confocal laser scanning microscopy (CLSM) to pulp and paper research, *Paperi ja Puu - Paper and Timber*, **75** (1-2), 74-79.
15. Paavilainen, L., 1993, Importance of cross-dimensional fibre properties and coarseness for the characterisation of softwood sulphate pulp, *Paperi ja Puu - Paper and Timber*, **75**, 343-351.
16. Seth, R.S., Jang, H.F., Chan, B.K., Wu, C.B., 1997, Transverse dimensions of wood pulp fibres and their implications for end use, in Proc. *The Fundamental of Papermaking Materials*, Cambridge, 473-500.
17. Xu, L., Filonenko, Y., Li, M., Parker, I., 1997, Measurement of wall thickness of fully collapsed fibres by confocal microscopy and image analisys, *Appita*, **50** (6), 501-504.
18. Xu, L., Parker, I., Osborne, C., 1997, Technique for determining the fibre distribution in the z-direction using confocal microscopy and image analysis, *Appita*, **50** (4), 325-328.