



Escuela de  
Ingeniería y Arquitectura  
Universidad Zaragoza



Instituto de Ciencia  
de Materiales de Aragón

**ESCUELA UNIVERSITARIA DE INGENIERIA TECNICA  
INDUSTRIAL. UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**Chemical Modification of Albardine (*Lygeum Spartum*)  
Fibres: Microphotographic Atlas.**

**Modificación Química de Fibras de Albardín (*Lygeum spartum*): Atlas Microfotográfico.**

**ALUMNO: DAVID LÓPEZ BERZOSA**

**DIRECTOR: Dr. FERNANDO NAVARRO GÓMEZ**

**ESPECIALIDAD: QUÍMICA INDUSTRIAL**

**CONVOCATORIA: JUNIO 2012**

# **Chemical Modification of Albardine (*Lygeum Spartum*) Fibres: Microphotographic Atlas.**

## **Modificación Química de Fibras de Albardín (*Lygeum spartum*): Atlas Microfotográfico.**

**Proyecto Fin de Carrera; Ingeniería Técnica Industrial: Especialidad:  
Química Industrial**

Escuela de Ingeniería y Arquitectura. Universidad de Zaragoza.

Alumno: *David López Berzosa*.

Director: *Dr. Fernando Navarro Gómez*. (Dpto. Química Orgánica)

Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón

Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad de Zaragoza.

### **Summary**

Albardine (*Lygeum spartum*) is a grass steppe of socioeconomic and ecological relevance. The results of the study of the anatomy, morphology, isolation and chemical modification of albardine fibres are presented in this work. Chemical modification of fibres cell wall is carried out by acetylation, cyanoethylation and acid and alkaline treatments, in the laboratory and directly in the stage of the polarizing microscope. Optical microscopy studies of the swelling and dissolution mechanisms of fibers in different solvents revealed that modified fibres display new phenomena which are not described in the literature. In particular, native and conventionally acetylated fibers showed the same swelling and dissolution mechanisms than those which have been described for native cellulosic fibres. Which is due to that conventional acetylation does not alter the solubility differences between different cell wall layers. However, selective acetylation of primary cell wall makes this wall totally insoluble in solvents which dissolve secondary cell wall easily. Consequently, upon swelling and dissolution of selectively acetylated primary cell wall fibres, new phenomena are observed which does not appear in conventionally acetylated and native fibres. The different characteristics of these new and conventional swelling and dissolution mechanisms are thoroughly illustrated with more than 80 figures and microphotographs.

## Resumen

En este trabajo se presentan los resultados del estudio de la anatomía, morfología, aislamiento y modificación química de fibras de albardín (*Lygeum spartum*), planta de importancia socioeconómica y ecológica. La modificación de la pared celular de las fibras se realiza mediante tratamientos ácidos, alcalinos, acetilación y cianoethylación, en el laboratorio y directamente en la platina del microscopio polarizador. El estudio mediante microscopía óptica de los mecanismos de hinchado y disolución de las fibras en diferentes disolventes y reactivos, revela que las fibras modificadas presentan nuevos fenómenos no descritos en la bibliografía. En particular, las fibras de albardín nativas y las acetiladas convencionalmente, muestran los mismos mecanismos de hinchado y disolución descritos para otras fibras celulósicas nativas. Esto es debido, a que la acetilación convencional no altera las diferencias de solubilidad entre las distintas capas de la pared celular. Sin embargo, la acetilación selectiva de la pared primaria **P1**, convierte esta pared en completamente insoluble en disolventes que rápidamente disuelven la pared secundaria. Como consecuencia del incremento en la diferencia de solubilidad entre la pared primaria y secundaria, durante el hinchado y disolución de las fibras con la **P1** selectivamente acetilada, se observan nuevos fenómenos que no aparecen en las fibras nativas y acetiladas normalmente. Estos fenómenos se comparan con los comúnmente observados, detallando sus diferentes características con más de 80 microfotografías y figuras ilustrativas.

# INDICE

1.- Introducción	<b>5</b>
2.- Anatomía de las hojas de albardín	<b>5</b>
3.- Aislamiento de las fibras de albardín	<b>9</b>
3.1.-Tratamiento normal (químico)	<b>9</b>
3.2.-Tratamientos mecánicos y químicos	<b>11</b>
3.2a.- Mercerización	<b>11</b>
3.2b.- Blanqueado (tratamiento ácido)	<b>14</b>
3.3.- Enriado ( <i>tratamiento enzimático, mecánico y químico</i> )	<b>14</b>
4.-Fibras aisladas, haces de fibras y fibras técnicas	<b>16</b>
5.- Morfología de las fibras de albardín: Paredes celulares primaria <b>P1</b> y secundaria	<b>21</b>
6.- Estudio de la reactividad de las fibras de albardín mediante microscopía óptica	<b>24</b>
6.1.- Mecanismos de hinchado y disolución de fibras celulósicas nativas descritos en la bibliografía	<b>25</b>
6.1.1.- Gradiente de solubilidad en la pared celular	<b>25</b>
6.1.2.- Rotura de la pared primaria: Formación hilos espirales, anillos y collares	<b>26</b>
6.1.3.- Formación de balones	<b>28</b>
6.1.4.- Clasificación de los mecanismos de hinchado y disolución en función de la naturaleza del disolvente	<b>29</b>
6.1.5.- Fragmentación de las fibras celulósicas nativas	<b>32</b>
6.1.6.- Contracción de fibras celulósicas nativas	<b>33</b>
6.1.7.- Rotación de las fibras celulósicas nativas	<b>33</b>

6.2.- Mecanismos de hinchado y disolución de fibras de albardín nativas y modificadas	<b>34</b>
6.2.1.- Introducción: Observación microscópica de las fibras de albardín	<b>35</b>
6.2.2.- Gradiente de solubilidad en la pared celular: Insolubilidad de la pared primaria P1	<b>37</b>
6.2.3.- Rotura de la pared primaria: Formación cintas corrugadas	<b>38</b>
6.2.4.- Formación de balones: Ballooning no convencional, ballooning localizado en algunas dislocaciones y ballooning de células asociadas a las fibras de albardín	<b>45</b>
6.2.4.1.- Formación de balones: Ballooning no convencional	<b>45</b>
6.2.4.2.- Formación de balones localizados en dislocaciones	<b>51</b>
6.2.4.3.- Ballooning de células asociadas a fibras de albardín	<b>52</b>
6.2.4.3.1.- Introducción: Células asociadas a las fibras de albardín	
6.2.4.3.2.- Disolución e hinchado de células asociadas a las fibras de albardín	<b>55</b>
6.2.5.- Clasificación de los mecanismos de hinchado y disolución de las fibras de albardín nativas y modificadas en función de la naturaleza del disolvente	<b>57</b>
6.2.6.- Fragmentación de las fibras de albardín	<b>58</b>
6.2.7.- Contracción y rotación de fibras albardín	<b>61</b>
7.- Parte experimental	
7.1.- Aislamiento de las fibras de albardín	<b>64</b>
7.2.- Acetilación de fibras de albardín	<b>64</b>
7.2.1.- Introducción	<b>64</b>
7.2.2- Acetilación de fibras de albardín en la platina del microscopio	<b>65</b>
7.2.3- Acetilación de fibras de albardín en el laboratorio	<b>68</b>
7.2.4- Acetilación de fibras de albardín con yodo como catalizador	<b>70</b>
7.3.- Cianoethylación de fibras de albardín	<b>71</b>

## 1.- Introducción

Albardín (*Lygeum spartum L.*) y esparto (*Stipa tenacissima L.*, su nombre árabe es alfa) son gramíneas (poaceas) perennes, endémicas del oeste del mediterráneo. Frecuentemente, crecen juntos ocupando extensos terrenos áridos y semiáridos del norte de África y del sur, levante y baleares españoles [1, 2], donde encuentran numerosas aplicaciones agrícolas e industriales y son especies de gran importancia ecológica y económica [3]. Debido a su extensivo sistema radicular, resultan útiles en la fijación, estabilización y recuperación de suelos. Evitan y previenen la erosión y desertización de suelos secos, salados y ricos en yeso con fuertes pendientes o próximos al mar [4-6]. Sus hojas se emplean como forraje, material de construcción y tradicionalmente en la artesanía de objetos fibrosos, cuerdas, alfombras, etc. [7]

Su principal aplicación industrial es la preparación de pulpa celulósica para papeles de alta calidad [8, 9]. Las fibras de albardín y esparto, presentan una composición con aproximadamente un 70% holocelulosa, 20% de lignina (Klason) y 45% de  $\alpha$ -celulosa, mientras que su pulpa blanqueada contiene más del 75% de  $\alpha$ -celulosa [8, 9].

Recientemente, sus fibras están sustituyendo a las fibras de vidrio y sintéticas como refuerzo en composites biodegradables, debido a su gran resistencia mecánica, ligereza, abundancia, asequibilidad y bajo impacto medioambiental [10-14].

El albardín resulta inconfundible por sus característicos inflorescencia y fruto. Nuestras muestras de albardín, se recolectaron en la primavera 2010 en plena depresión del valle del río Ebro [1]. Concretamente, se cosecharon en el Acampo Barta en las inmediaciones del barrio de Valdespartera de la ciudad de Zaragoza (Aragón, España), donde es localmente muy abundante y dominante cuando coloniza los viejos campos de cultivo abandonados, más agrestes. El albardín es común en la depresión del valle del Ebro y característico de la región de los Monegros. Por el contrario, el esparto (*Stipa tenacissima L.*) es muy raro en Aragón [2].

## 2.- Anatomía de las hojas de albardín

Las hojas de albardín y esparto presentan una anatomía muy similar [15-20]. Aparecen completamente enrolladas formando un cilindro muy compacto que aloja en su interior unas estructuras casi cilíndricas, que son las costillas de los nervios. Estas costillas, aparecen totalmente recubiertas por una gruesa capa de células epidérmicas provistas de pelos o papilas con forma característica de domo en el albardín y de coma o gancho en el esparto (fotos 3 y 4).

Las fotos 1 y 2 muestran una serie de microfotografías donde se señalan las zonas de localización de las fibras en un corte transversal de una típica hoja de albardín utilizada en este estudio (gruesa rodaja de la parte central de una hoja madura).

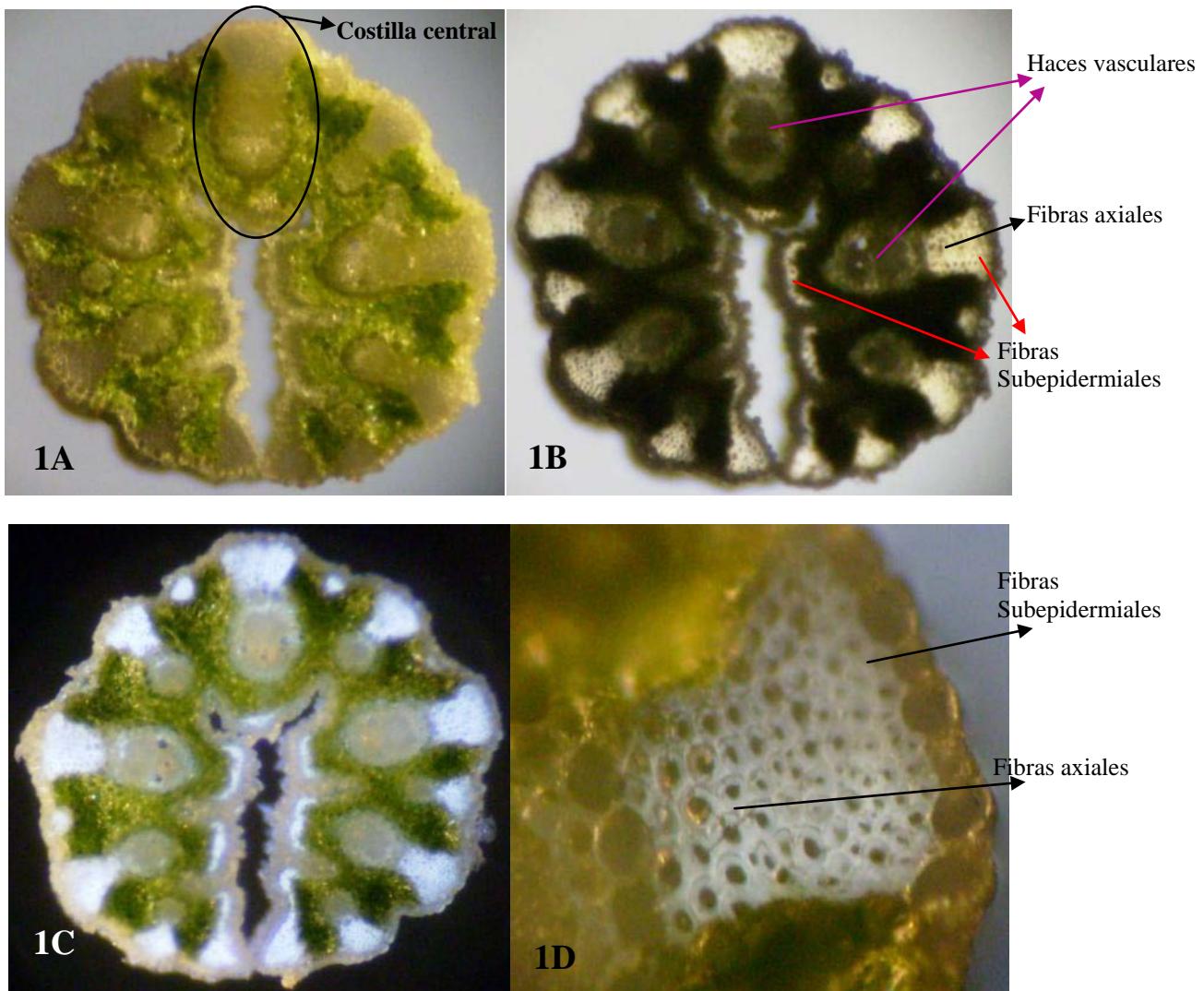


Foto 1A (50X) muestra el corte transversal iluminado por arriba y abajo, donde aparece el tejido mesófilo verde y el resto de tejidos en color blanco.

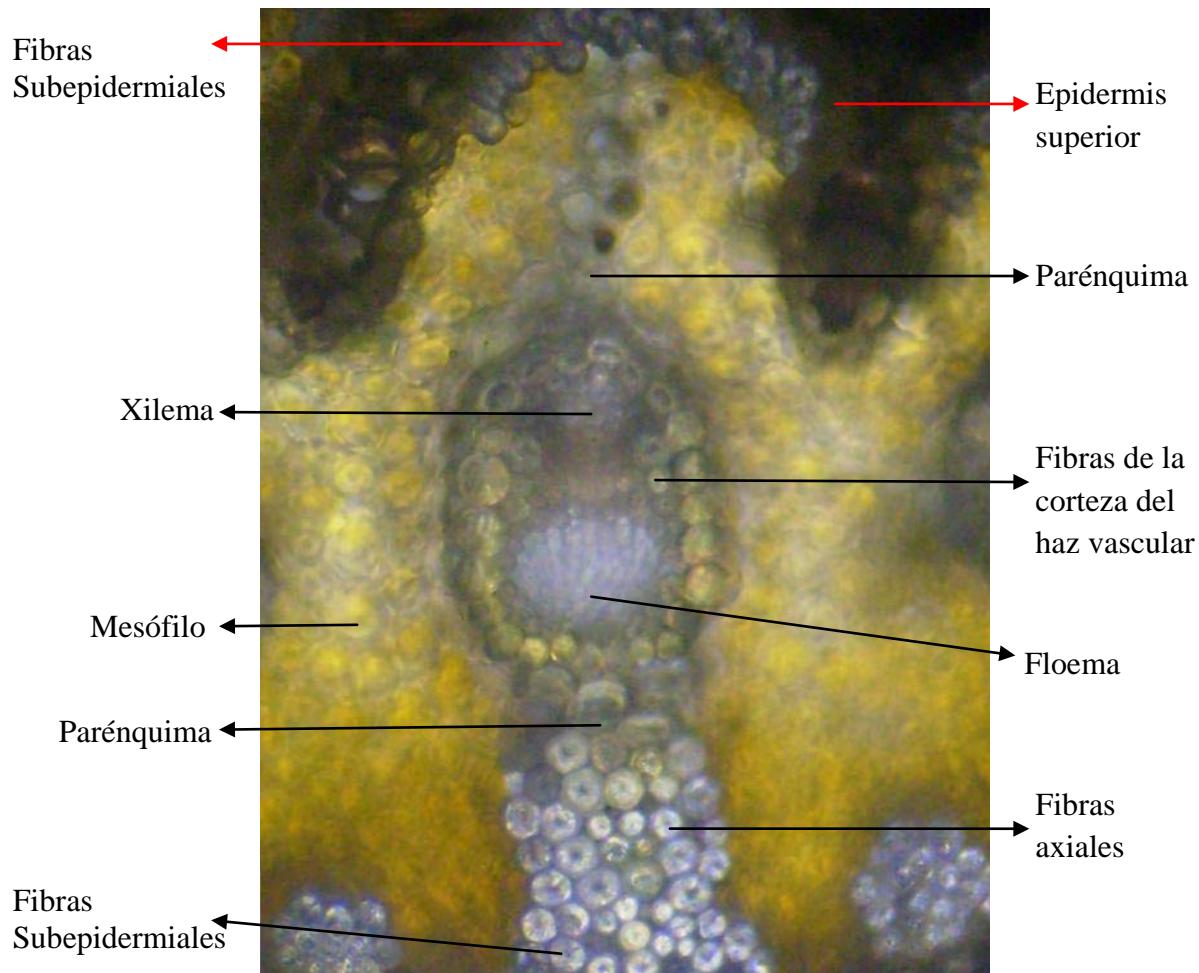
Foto 1B (50X) muestra el mismo corte iluminado solo desde abajo y con luz polarizada (polarizadores casi cruzados), donde aparecen las fibras en color blanco, mesófilo en negro y haces vasculares y epidermis marrones. Puede apreciarse, que las fibras ocupan un porcentaje elevado de la superficie de la hoja, similar al ocupado por los haces vasculares. La mayoría de las fibras se encuentran bajo la epidermis (interior y exterior) y en el eje de la fibra, mientras que en los haces vasculares son poco abundantes.

Foto 1C (50X) muestra el corte iluminado por arriba y abajo con luz polarizada (polarizadores completamente cruzados), donde aparece el tejido mesófilo verde y el resto de tejidos en color blanco, excepto las fibras que aparecen en blanco-azulado fuertemente iluminadas.

Foto 1D (200X) muestra una ampliación de la foto 1C, donde pueden apreciarse con cierto detalle las fibras de un grueso haz bajo la epidermis exterior. Este haz aparece compuesto de fibras en color blanco (axiales y subepidermiales) con su lumen en color negro (en el centro de la fibra).

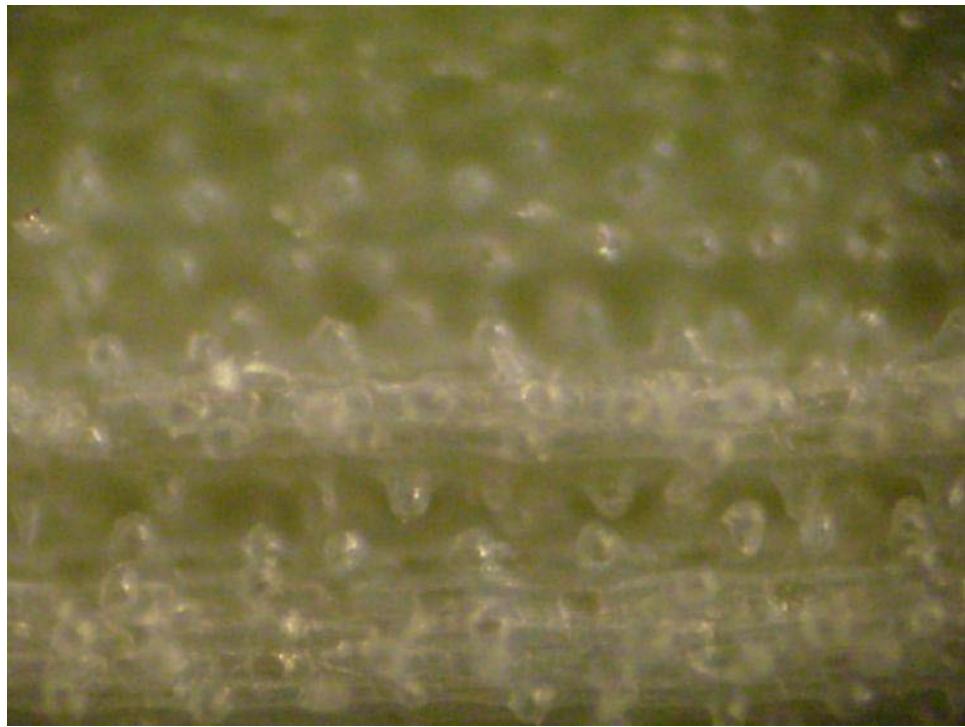
Foto 2 (200X) es una ampliación de una de las costillas del corte de la foto 1, donde se señala la distribución de los tejidos presentes en esta sección transversal de una de las costillas de un nervio de una hoja madura de albardín (región media de la hoja) [15, 19].

Estas costillas de los nervios de las hojas de albardín y esparto, de forma casi cilíndrica, se consideran fibras técnicas y generalmente, están formadas por manojos de fibras subepidermiales cubiertos por la gruesa capa de células epidérmicas, caracterizadas por la forma de sus papillas [10, 18].

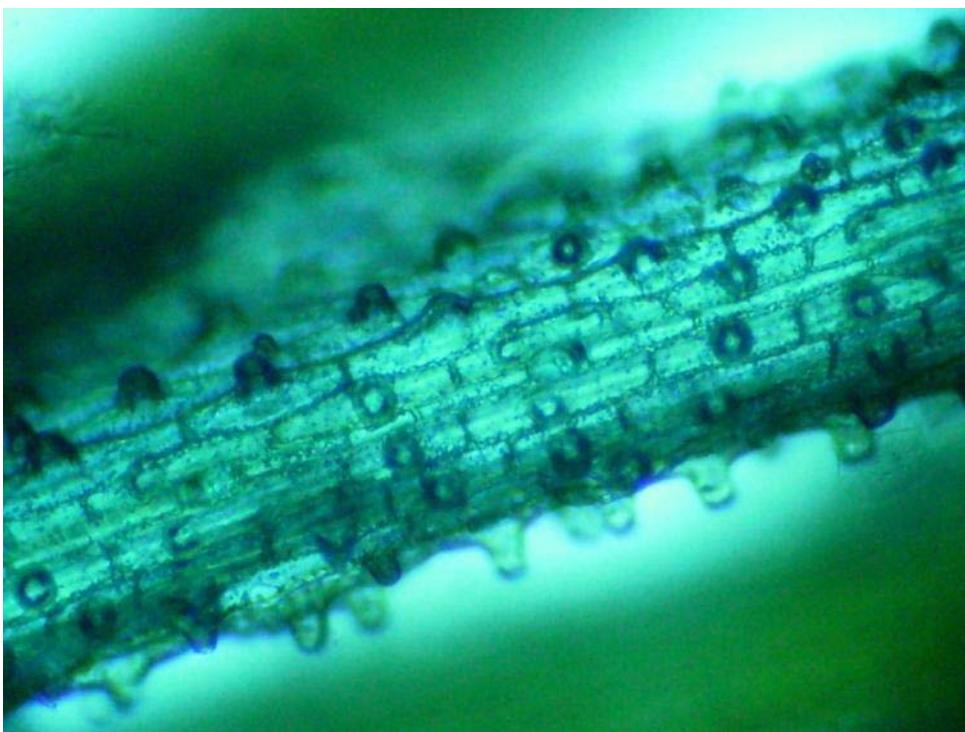


**Microfotografía 2 (200X)**

Las siguientes microfotografías 3 y 4 muestran estas fibras técnicas en el albardín verde recién cosechado.



**Microfotografías 3 y 4** (100X) muestran algunos detalles de fibras técnicas de albardín verde recién cosechado. (Arriba, muestra iluminada desde arriba) Corte longitudinal de la zona media de una hoja de albardín mostrando su interior tapizado por las costillas de los nervios. Puede observarse que estas estructuras quedan perfectamente engranadas entre si, a través de sus papilas con forma de domo. (Abajo, muestra con iluminación superior e inferior) Detalle de una de estas estructuras donde pueden apreciarse la característica forma de sus células epidérmicas. Generalmente, cada una de estas células exhibe una única protuberancia con forma de domo.



### **3.- Aislamiento de las fibras de albardín**

Para aislar las fibras del resto de tejidos de la planta de albardín, sometemos a esta planta entera o a sus hojas, a los diferentes tratamientos mecánicos, químicos y enzimáticos que se detallan a continuación.

**3.1.-Tratamiento normal (químico):** Partimos de la planta entera y únicamente se trata con disolución de NaOH (10%). A este proceso lo llamaremos de aquí en adelante proceso de **deslignificación**.

**3.2.-Tratamientos mecánicos y químicos:** Partimos únicamente de hojas de albardín seleccionadas que se tratan mecánica y químicamente, según los siguientes procesos:

3.2a.- **Mercerización:** Las hojas de albardín seleccionadas se tratan mecánicamente (majado) y después con disolución de NaOH de poder Mercerizador (18%).

3.2b.- **Blanqueado (tratamiento ácido):** Las hojas de albardín mercerizadas (según el procedimiento anterior 3.2a) se tratan con disolución de agua oxigenada en ác. acético.

**3.3.- Enriado (tratamiento enzimático, mecánico y químico):** La planta entera de albardín se sumerge en agua durante un mes, después se trata mecánicamente (majado) y finalmente con NaOH (10%) según el tratamiento normal (3.1).

Estos procesos resultan eficaces para eliminar los tejidos mesófilo y parenquimático prácticamente por completo, pero ninguno es capaz de eliminar la epidermis ni los haces vasculares totalmente. Tampoco consiguen deshacer todos los haces de fibras (formando fibras elementales individualizadas) completamente. Por consiguiente, las muestras de fibras de albardín empleadas en este estudio consisten en fibras elementales (células) mezcladas con haces de fibras y fragmentos de epidermis y haces vasculares, en diferentes proporciones.

#### **3.1.-Deslignificación: Tratamiento normal (químico):**

Este es el tratamiento más práctico, menos drástico y de mayor rendimiento de los que empleamos para aislar las fibras de albardín. Aunque las fibras obtenidas por este método aparecen mezcladas con fragmentos de epidermis y haces vasculares, los otros métodos de aislamiento no consiguen evitar esta contaminación, únicamente la reducen. Por consiguiente y de no ser que se especifique lo contrario, todos los experimentos

realizados en este estudio se realizan con fibras tratadas mediante este “proceso normal” que llamamos de deslignificación (por motivos prácticos).

Se parte de la planta entera, la cual se trata únicamente con NaOH de concentración moderada, durante un breve tiempo y a temperatura moderada. Una vez tratadas, las fibras se recogen rápida y cómodamente lavándolas directamente bajo el grifo, evitando tediosos procesos de filtración y lavado.

**El procedimiento es el siguiente:** Se recogieron las plantas enteras de albardín (a excepción de raíces, flores y frutos) y se dejaron secar al aire y a la sombra. Una vez seca, la planta entera se mantiene sumergida en una disolución de **NaOH al 10%** (50 mL por gramo de albardín seco) durante 1 hora a 80°C, con agitación manual ocasional (de aquí en adelante y para abreviar, a este tratamiento le llamaremos deslignificación). Después, se lava con abundante agua directamente bajo el grifo y luego se sumerge durante 15 minutos en **ác. acético del 0.5%** y se vuelve a lavar con abundante agua. Se deja secar al aire o en estufa a 60°C (24 horas) hasta peso constante. Finalmente, las fibras se cortan en fragmentos de 0.5 cm y se muelen (durante 30 - 60 segundos) en un molinillo convencional de café. El rendimiento final es aproximadamente del 50-60% de fibra seca y molida.

Las fotografías siguientes 5 y 6, muestran la planta de albardín tal y como se cosecha, después de su deslignificación y una vez molida y lista para ser modificada químicamente. En estas fotos, también aparece un film o película de triacetato de celulosa de albardín, obtenido mediante la evaporación de una disolución en diclorometano, de la planta acetilada (45°C y 40 mL Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> por gramo de albardín acetilado).



**Fotografía 5** (página anterior), muestra la planta de albardín con distintos grados de procesado. (Izquierda) Albarbín tal y como se cosecha, el mismo una vez deslignificado (en el centro) y deslignificado y molido (en la derecha). En el centro superior, aparece un film de acetato de celulosa de albardín (0.05mm de espesor) con una moneda sobre el centro y otra bajo la parte superior del film.



**Fotografía 6.** Detalle del film de albardín acetilado, con la moneda superior sobre el film y la inferior debajo del film. Puede observarse que la película no es completamente transparente, presenta una ligera coloración marrón y numerosas impurezas sólidas embebidas en la matriz de triacetato de celulosa.

### 3.2a.-Mercerización.

Este y los siguientes métodos, pretenden reducir la contaminación de las fibras deslignificadas por el procedimiento “normal” (detallado en el apartado anterior). Esto es debido, a que el tratamiento normal de la planta de albardín conduce a la obtención de fibras contaminadas con abundantes fragmentos de epidermis y haces vasculares. En estos métodos de mercerización y blanqueado, utilizamos partes seleccionadas de las plantas de albardín (parte media de las hojas).

Este método, es bastante más drástico que el “proceso normal”, pero menos que el siguiente método de blanqueado. Como en el método normal, el albardín únicamente se trata con disoluciones básicas aunque en condiciones mucho más drásticas.

**El procedimiento es el siguiente:** Se recogieron las plantas enteras de albardín (a excepción de raíces, flores y frutos) y con una tijera se separaron la parte media de las hojas más grandes y sanas (cortando con las tijeras los extremos de las hojas seleccionadas), las cuales se dejaron secar al aire y a la sombra. Una vez secas, estas hojas se machacan con una maza sobre una superficie de madera hasta que se desfibrilan (proceso de majado).

Por este **procedimiento de majado**, cada hoja se divide aproximadamente en una veintena de finos filamentos (fotos 7 y 8) que conservan la misma longitud que la hoja original y que esencialmente consisten en haces de fibras con restos de otros tejidos adheridos. Durante el majado se desprende un polvo verde muy fino (foto 9) que hay que evitar respirar, pues cuando la hoja está contaminada con hongos (como *aspergillus fumigatus*) puede producir la enfermedad conocida como espartosis o enfermedad de los trabajadores del esparto [21, 22].

El examen en el microscopio de este polvo fino muestra que principalmente, está compuesto de tejido mesófilo (de ahí su intenso color verde) adherido a fragmentos de epidermis y haces vasculares. La contaminación de las hojas con hongos es especialmente fácil, cuando estas se someten al **proceso de enriado** como detallaremos en el próximo apartado sobre el proceso de enriado.

Las hojas seleccionadas de albardín una vez majadas, se cortan con tijeras en fragmentos de unos 5cm y se sumergen en una disolución acuosa hirviendo de **oxalato amónico o EDTA al 2%**, manteniendo la ebullición durante 2 horas y con agitación magnética.

Después, las hojas cortadas se escurren y lavan con agua fría bajo el grifo y directamente se introducen en una disolución acuosa hirviendo de **NaOH al 18%** (50 mL por gramo de albardín seco) y se mantiene la ebullición durante otras 2 horas, con agitación magnética.

Entonces las fibras se recogen mediante filtración a vacío y se lavan con abundante agua destilada. Luego se sumergen durante 15 minutos en **ác. acético del 5%** (a 20°C), asegurándose de que la disolución resulta neutra o ácida.

Después, las fibras se recogen mediante filtración a vacío y se vuelven a lavar con abundante agua destilada. Se dejan secar al aire o en estufa a 60°C (24 horas) hasta peso constante.

Finalmente, las fibras se cortan en fragmentos de 0.5 cm y se muelen (durante 30 segundos o 1 minuto) en un molinillo convencional de café. El rendimiento final es aproximadamente del 30-40% de fibra seca y molida.



**Fotografías 7 y 8** muestran detalles de las hojas seleccionadas de albardín verde seco. Arriba la foto 7, muestra en la parte superior, las hojas de albardín antes de su majado y en la parte inferior las hojas una vez majadas. Abajo la foto 8, muestra un detalle de los fragmentos de las hojas majadas y listas para tratamiento químico.





**Fotografía 9**, muestra un detalle del fino polvo desprendido durante el majado de las hojas seleccionadas de albardín verde y seco.

### **3.2b.-Blanqueado (tratamiento ácido).**

Los procesos anteriores en medio básico no consiguen eliminar la epidermis ni los haces vasculares de las hojas de albardín. Por este motivo, parte de las hojas de albardín sometidas al proceso de mercerización se trataron con agua oxigenada en medio ácido [23].

**El procedimiento es el siguiente:** Las fibras Mercerizadas de acuerdo con el proceso detallado en el apartado anterior, se introducen en una mezcla de **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y ác. acético glacial** [1:1 (v:v) (50 mL por gramo de albardín seco)], durante 2 horas a 90°C y con agitación magnética. Después, las fibras se recogen mediante filtración a vacío y se lavan con abundante agua destilada. Se dejan secar al aire o en estufa a 60°C (24 horas) hasta peso constante. Finalmente, las fibras se cortan en fragmentos de 0.5 cm y se muelen (durante 30 segundos - 1 minuto) en un molinillo convencional de café. El rendimiento es aproximadamente del 85-90% de las fibras Mercerizadas de partida.

### **3.3.-Enriado (tratamiento enzimático, mecánico y químico).**

En el proceso de aislamiento de fibras vegetales mediante enriado, las plantas se someten a la acción de microorganismos presentes en las propias plantas (principalmente, hongos como *Aspergillus niger* y bacterias pectinolíticas). Una vez

cosechadas, las plantas se dejan pudrir al aire en el propio campo de cultivo o sumergiéndolas en balsas de agua o tratándolas con enzimas en tanques de agua caliente. Estos procesos contribuyen a aislar las fibras, debido a que los microorganismos presentes en las plantas y en el medio de enriado, segregan pectinasa que hidrolizan las pectinas que mantienen las fibras unidas en haces [24, 25].

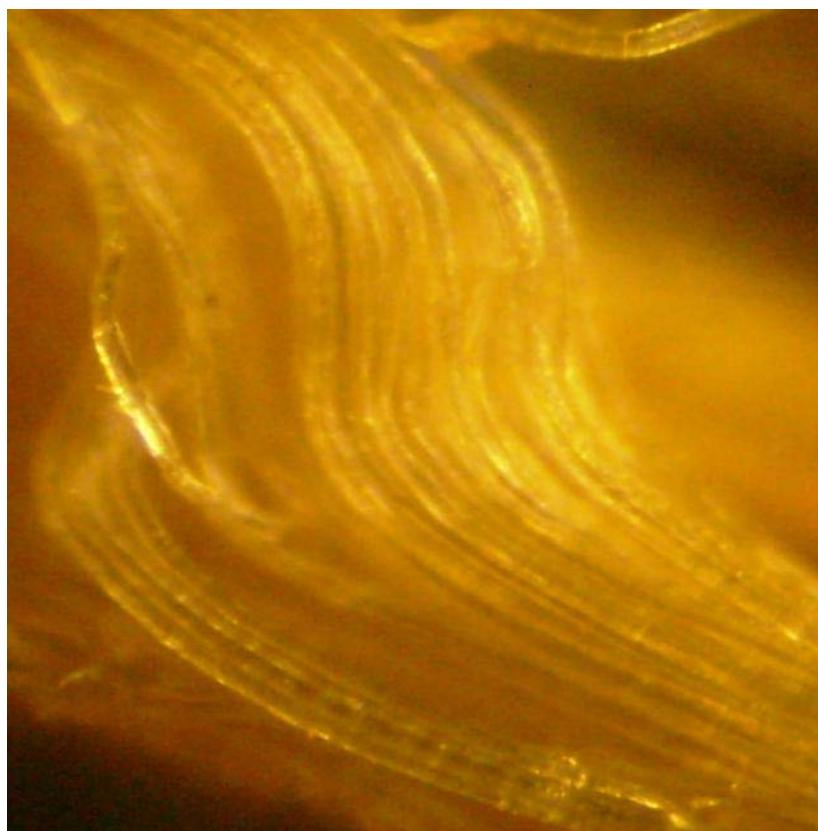
**El procedimiento es el siguiente:** Las plantas enteras de albardín (a excepción de raíces, flores y frutos) se sumergen en agua a la intemperie, al menos durante 3 semanas. Después de una semana, el agua oscurece ostensiblemente y desprende un fuerte olor a descomposición (amoniaco). Pasadas 3 semanas, se observa que las hojas se desfibrilan con gran facilidad simplemente apretándolas entre los dedos. En este momento se sacan del agua (este agua se conserva), se lavan con agua limpia y se dejan secar al sol. Una vez secas, las plantas se someten a un cómodo proceso de majado ya que las hojas enriadas se deshacen en filamentos con mucha facilidad. Una vez majadas, se vuelven a sumergir en agua (la misma reservada del proceso de enriado), durante otras 3 semanas (foto 10). Al final de todo este proceso de enriado, las fibras se someten al “proceso normal” de deslignificación, detallado en el apartado anterior (apartado 3.1).



**Fotografía 10,** muestra un detalle de las plantas de albardín majadas y enriadas durante un mes. Las plantas se extrajeron del agua de enriado (al fondo de la foto, donde han permanecido sumergidas al menos un mes) durante un breve momento para tomar esta foto. Puede observarse que las hojas han perdido su color verde y se han deshecho formando numerosos filamentos largos y finos.

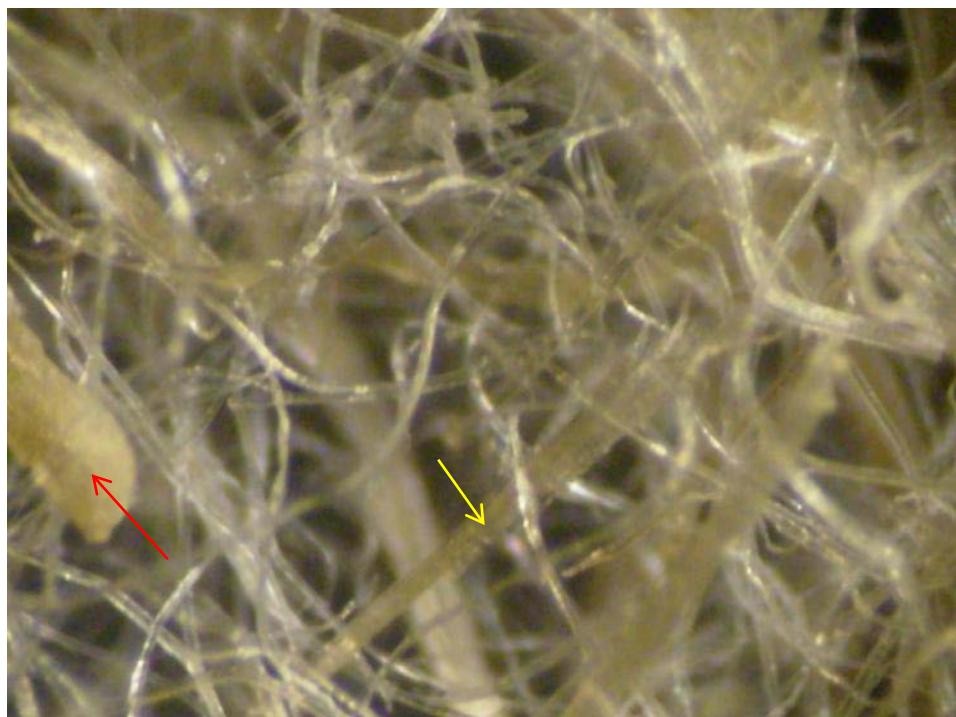
#### **4.-Fibras aisladas, haces de fibras y fibras técnicas.**

Microfotografía 11, muestra un grueso haz de fibras de albardín sometido a proceso de Mercerizado, puede observarse que algunas de las fibras están completamente sueltas y la mayoría no parecen estar fuertemente unidas. Microfotografías 12 y 13, muestran las fibras de albardín sometidas al proceso “normal” de deslignificación y después molidas. Aunque puede apreciarse que muchas fibras aparecen individualizadas, otras tantas aparecen en haces de diferentes grosores. Además, también se observan fibras técnicas que frecuentemente solo contienen unas pocas fibras subepidermiales bajo la gruesa corteza epidérmica. Algunas de estas estructuras, pueden resistir no solo el proceso de deslignificación y molienda, sino que pueden permanecer sin deshacerse durante la totalidad del procesado de las fibras (como muestran las microfotografías 14 a 17).

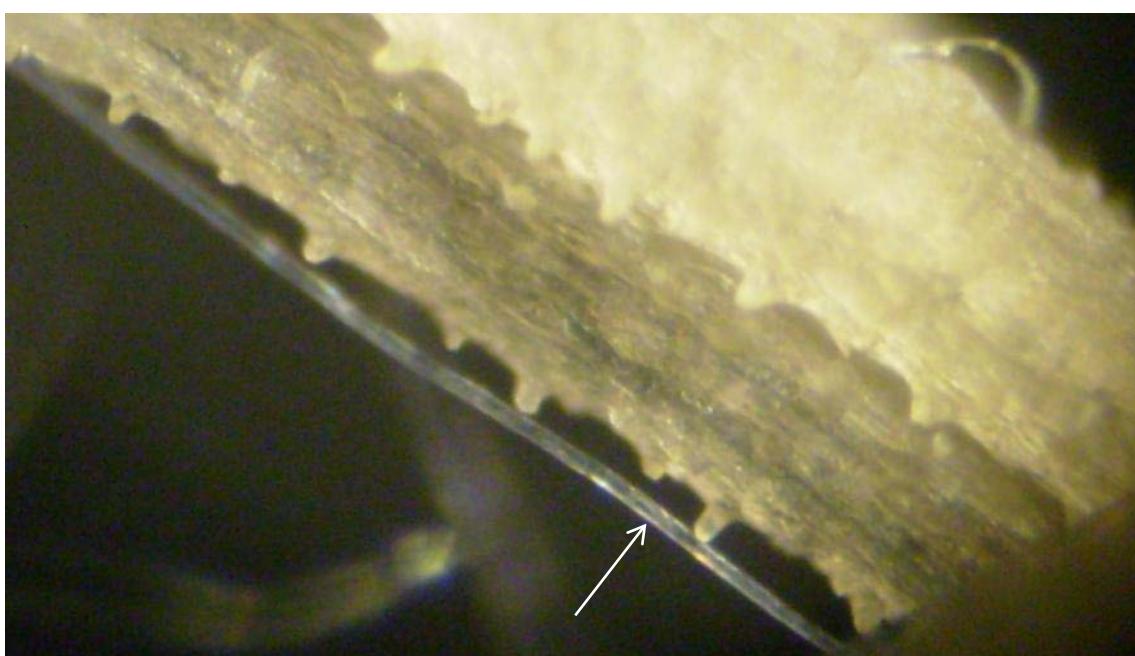


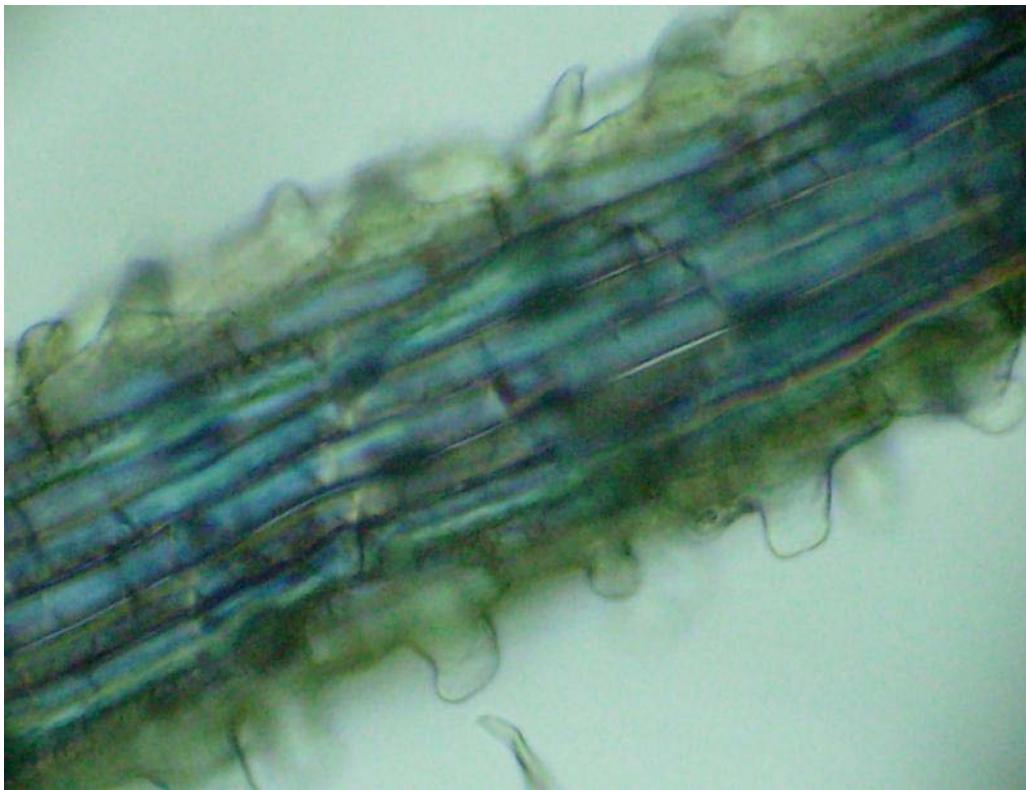
**Microfotografía 11** (200X) Grueso haz de fibras de albardín mercerizado.

Resulta esencial, que las fibras elementales (células) lleguen a individualizarse para que los reactivos puedan acceder hasta las cadenas de celulosa de la pared celular. Generalmente, las fibras técnicas que no se han deshecho durante su aislamiento y molienda, lo hacen durante los diferentes procesos químicos posteriores, dejando libres fibras (células) individualizadas, haces de fibras y un gran número de células epidérmica sueltas, fácilmente reconocibles por su característica papila con forma de domo y su forma de peine de gruesas púas.



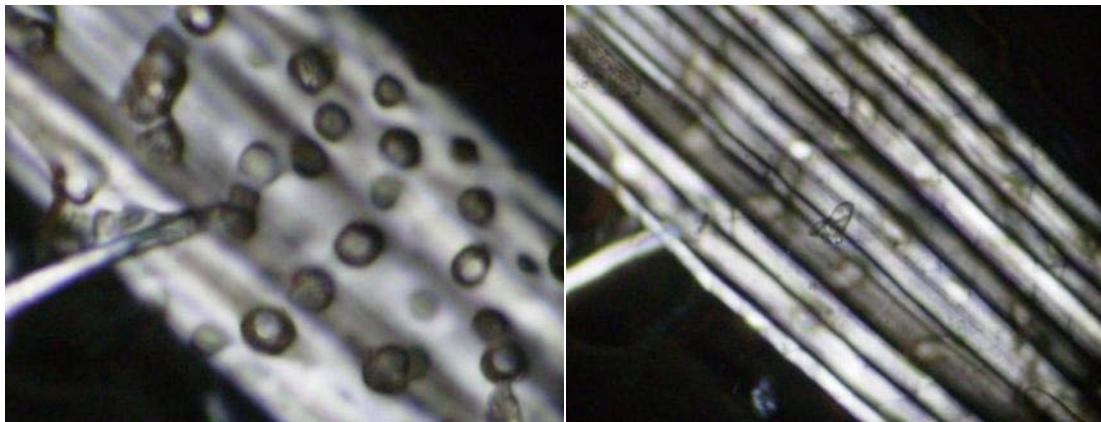
**Microfotografías 12 y 13** (muestras iluminadas desde arriba), albardín sometido a proceso “normal” de deslignificación y molido. Arriba (100X), pueden observarse (células) fibras elementales individualizadas y haces o manojos de fibras de distintos grosores (flecha amarilla). La flecha roja señala una fibra técnica, es decir una costilla de un nervio de la hoja. En la foto de abajo, aparece una ampliación de esta fibra técnica (200X), en la que puede apreciarse que prácticamente esta hueca y que consta únicamente de una gruesa epidermis y una fina capa de fibras subepidermiales. La flecha blanca señala una de estas fibras individualizadas.





**Microfotografías 14 y 15** (200X, polarizadores paralelos) muestran detalles de fragmentos de fibras técnicas de albardín Mercerizado y molido, que ha sido tratado con ác. acético glacial durante 15 minutos a 20°C. Arriba, pueden observarse las fibras (células) debajo de la gruesa corteza epidérmica que aparece casi transparente por completo. En la foto de abajo, puede apreciarse que en este fragmento solo quedan unas pocas fibras (células) todavía parcialmente adheridas a la epidermis.



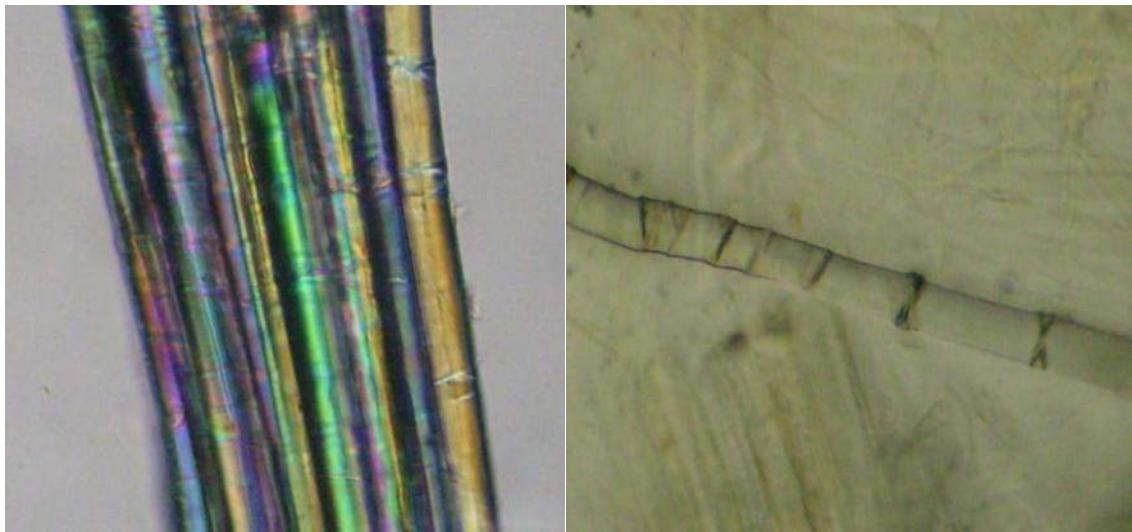


**Microfotografías 16 y 17** (polarizadores cruzados, 200X) muestran un mismo fragmento de una fibra técnica de albardín. Izquierda, enfocando en la corteza superior de epidermis (donde pueden apreciarse sus características protuberancias) y derecha, enfocando en los haces de fibras bajo la epidermis transparente. Este fragmento esta embebido en una matriz completamente transparente de acetato de celulosa de un film de albardín acetilado. Puede observarse, que las fibras aparecen muy débilmente birrefringentes, lo que sugiere que su grado de acetilación es considerable. No obstante, el hecho de que estas fibras no se hayan disuelto en el diclorometano empleado para preparar el film, puede ser debido a su incompleta acetilación y/o al efecto protector de la corteza epidérmica. Se tuvo especial cuidado en comprobar que la birrefringencia era debida a las fibras y que la contribución de la corteza epidérmica era despreciable (simplemente comparando con un fragmento contiguo desprovisto de epidermis).

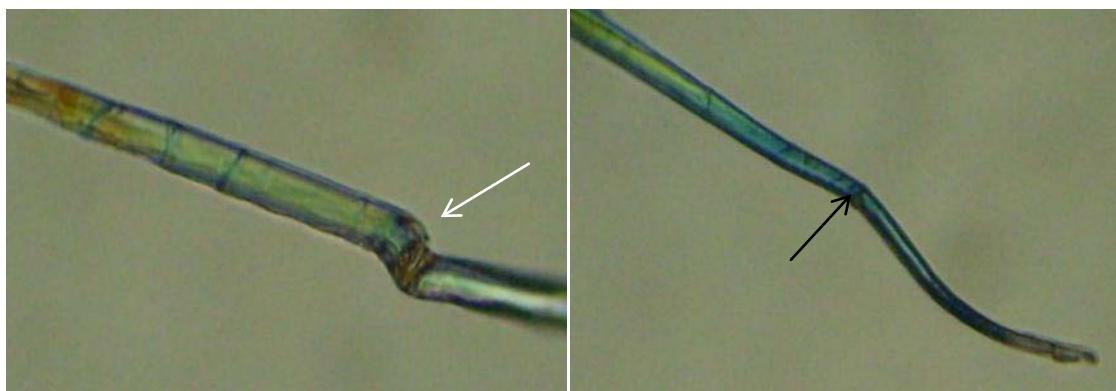
Microfotografías 18 a 21 muestran detalles de fibras de albardín vistas con luz polarizada. Todas muestran un gran número de defectos conocidos como nodos, dislocaciones, planos de deslizamiento, etc. Consisten en zonas de la fibra en las que las microfibrillas cambian de dirección. Unas son aparentes con luz normal, pero otras solo aparecen con luz polarizada.

Debido a la elevada orientación de la estructura cristalina de celulosa y de manera similar a las fibras de Kevlar [26], las fibras vegetales son rígidas y muy resistentes bajo tensión pero muy poco bajo compresión. Algunos de estos defectos se desarrollan durante el crecimiento de la planta (probablemente, simplemente por efecto del viento u otros factores de estresantes) y aumentan muy considerablemente en número e intensidad durante la manipulación y procesado de las fibras [27]. Se ha comprobado que desaparecen aplicando tensión en los extremos de la fibra (al reorientar las microfibrillas), pero reaparecen días o semanas después de relajar la tensión aplicada [28].

Las dislocaciones representan puntos débiles de la fibra, poco resistentes mecánica y químicamente, debido a que en estas zonas, la estructura de la fibra está dañada y/o deformada.. Por consiguiente, son las zonas de la fibra más sensibles a los disolventes y reactivos empleados en este estudio.



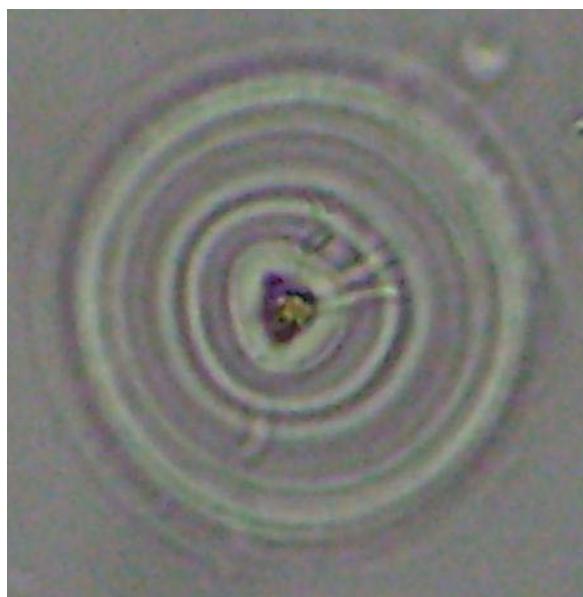
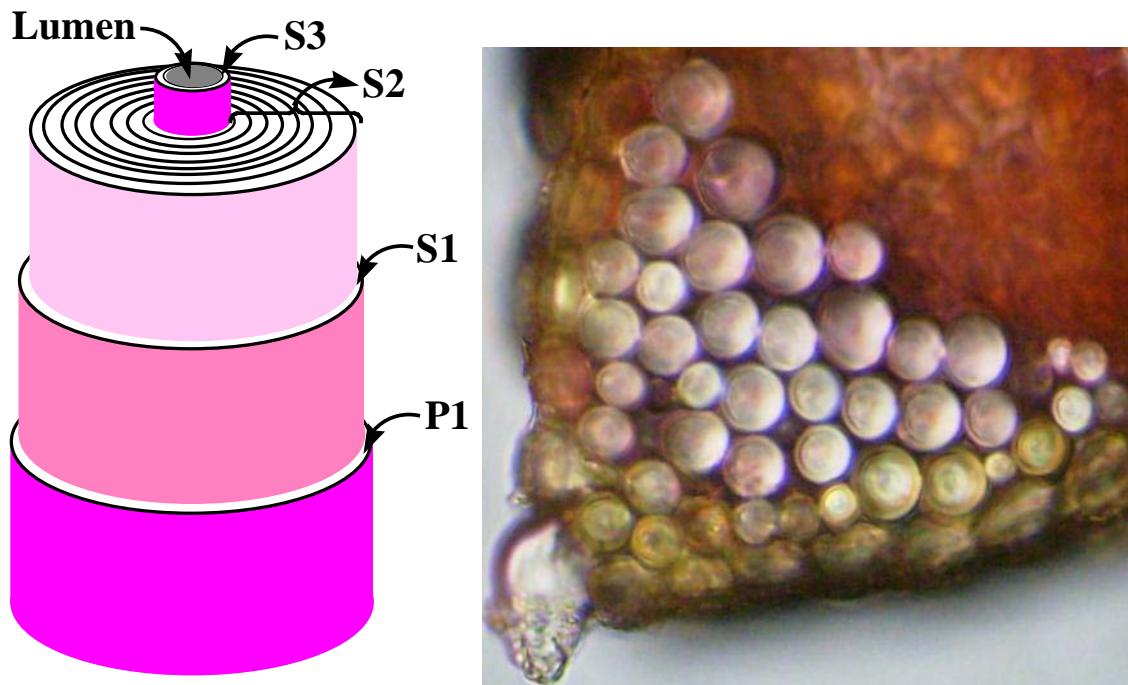
**Microfotografías 18 y 19 (200X)** muestran algunos detalles de fibras de albardín antes del proceso de acetilación (izquierda) y al final del proceso (derecha). (Izquierda, polarizadores cruzados 25°) Fibra técnica de albardín deslignificado, formada por un característico haz de células (fibras) de albardín. Pueden observarse numerosos defectos [dislocaciones, marcas superficiales transversales y longitudinales, algunas con forma de X de diferente intensidad, etc.] que en algunos casos coinciden en todo el haz. (Derecha, polarizadores paralelos) Detalle de un film de albardín mostrando una fibra embebida en la matriz de triacetato de celulosa. Aparentemente, esta fibra ha permanecido inalterada durante todo su procesado, ya que muestra características idénticas a las originales.



**Microfotografías 20 y 21** (polarizadores cruzados 25°, 200X). Fibras elementales de albardín mostrando numerosos defectos (dislocaciones, marcas superficiales transversales, etc.). En foto izquierda, aparece una dislocación drástica en forma de Z (flecha blanca). En la foto derecha, puede apreciarse la característica forma curvada y aguda de los extremos terminales de las fibras. La flecha negra señala el bulto característico (dislocación por compresión) en la parte cóncava de la curvatura, que indica que la forma curva es debida a que el extremo de la fibra ha sido dañado. Generalmente, las fibras de esparto presentan terminaciones menos agudas que las de albardín. Sin embargo, también presentan una pequeña proporción de fibras con terminaciones muy parecidas a la de la fotografía. Aunque menos frecuentemente, las fibras de albardín también pueden presentar terminaciones menos agudas y por tanto muy similares a las del esparto [29].

## 5.- Morfología de las fibras de albardín: Paredes celulares P1 y secundaria.

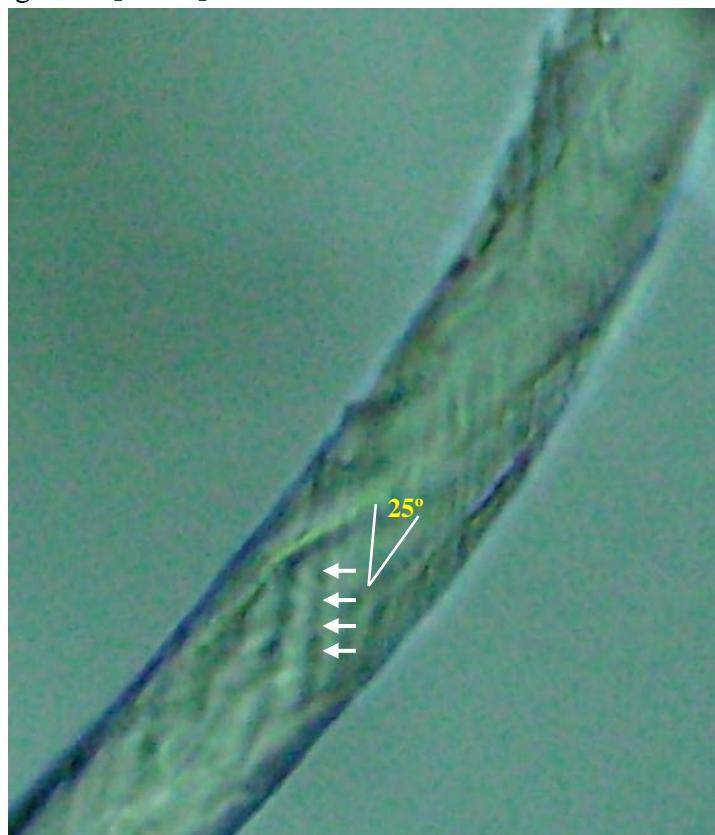
Las hojas de albardín y esparto presentan la misma diversidad y los mismos tipos de arquitectura en sus paredes celulares [15, 19]. Sus fibras maduras presentan un diámetro y longitud promedios de 0.010 mm y 1.5 mm. Poseen una gruesa pared celular que presenta una típica **estructura helicoidal o polilamelar**, con paredes primaria **P1** y secundaria. La pared secundaria muestra tres zonas de capas **S1**, **S2** y **S3** (externa, media e interna, respectivamente) que se diferencian entre sí, en espesor (espesor de **S2** mayor del 80% del espesor total) y estructura [principalmente, en el ángulo que forman las microfibrillas de celulosa con el eje de la fibra, (ángulo microfibrilar)] [15, 19].



Arriba a la izquierda, el dibujo representa esquemáticamente la morfología de una fibra de albardín. **Microfotografía 22** (arriba a la derecha, 200X), muestra un corte transversal de un haz de fibras localizado en un extremo lateral de una hoja de albardín. **Microfotografía 23** (izquierda, 200X), muestra una rodaja de una fibra de albardín, donde pueden apreciarse claramente las capas de la pared secundaria y el lumen [fibra macerada con  $H_2SO_4$  (38%, 12 h, 20°C) y después tratada con cuoxam].

Las dos paredes celulares primaria y secundaria, presentan **estructura polilamelar o helicoidal**. En esta estructura, las microfibrillas de celulosa están dispuestas paralelamente en láminas del grosor de una microfibrila, formando espirales alrededor del eje de la fibra. Entre láminas sucesivas, la inclinación de la hélice gira un ángulo constante con respecto a la anterior [30-34]. Esta disposición de las microfibrillas es similar a la de las moléculas quirales en las fases cristal líquido colestéricas [30-34]. En esta estructura celular helicoidal, las láminas individuales son fuertemente anisótropas, pero la pared celular en su conjunto resulta, poco o nada anisótropa. Por consiguiente, la estructura resulta muy resistente mecánicamente en todas las direcciones en el plano de la pared [30-34].

La pared primaria **P1** y las capas **S1** y **S3** de la pared secundaria de las fibras de albardín, presentan espesores similares ( $0.1 - 0.3 \mu\text{m}$ ) que resultan pequeños (5-10% del espesor total), si los comparamos con el de la **S2**, que es al menos 10 veces más gruesa ( $1-3 \mu\text{m}$ ). La **S2** muestra una estructura helicoidal o polilamelar, con numerosas capas sucesivas de microfibrillas de celulosa con diferentes orientaciones helicoidales. [15,19]. No hemos podido encontrar en la bibliografía ninguna referencia acerca del ángulo microfibrilar, en ninguna de las capas de la pared celular de las fibras de albardín. Pero en nuestras fotografías (microfotografía 24), el ángulo microfibrilar en la capa **S1** aparece bastante pequeño ( $\approx 25^\circ$ ), comparado con el correspondiente ángulo ( $60 - 80^\circ$ ) de otras fibras vegetales [30-34].



**Microfotografía 24** (200X), fibra de albardín en cuoxam. Bajo la deteriorada **P1** se aprecia la orientación de las macrofibrillas en la capa **S1** [fibra acetilada superficialmente después de macerada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (38%, 6 h, 20°C)].

En cada lámina de la pared celular de las fibras vegetales, las microfibrillas de celulosa se encuentran embebidas en una matriz amorfá compuesta principalmente de pectinas y hemicelulosas. Las pectinas son especialmente abundantes en las zonas exteriores de las fibras (pared **P1** y las zonas de unión entre fibras) y son las responsables de la cohesión en los haces de fibras. Estas pectinas pueden extraerse con agentes quelantes y disoluciones diluidas de bases en caliente. [30-34]

La zona de unión entre paredes **P1** de fibras adyacentes se le llama **lamela, lámina o laminilla media** y suele resultar difícil distinguirla de las paredes **P1** de fibras adyacentes. Esta zona intercelular presenta una elevada proporción de pectinas y normalmente, resulta disuelta durante el proceso de aislamiento de las fibras. De todas las capas de la pared celular, parece que la **P1** es la pared que más afectada puede resultar por el proceso de aislamiento de las fibras. Esto es debido, a que la **P1** también contiene pectinas y a que obviamente, es la pared más exterior de la fibra (la que está en contacto más directo con los reactivos).

Por consiguiente, las fibras pueden presentar su **P1** modificada por el proceso de aislamiento, en el sentido de que esta **P1** puede contener restos de la lámina media sin disolver y/o por que la **P1** ha resultado parcialmente disuelta o degradada. Evidentemente, cuando la **P1** resulta eliminada por completo, la capa **S1** se convierte en la pared más exterior de la fibra. Resulta fácil confundir **P1** con **S1**, cuando la fibra se trata con disolventes o agentes hinchantes y se observa mediante microscopía óptica. Estas paredes son de espesor muy similar y las más exteriores e insolubles de la pared celular. De hecho, desafortunadamente, durante muchos años [41], e incluso recientemente [23], se ha confundido la **P1** con la **S1**. Probablemente en estos casos, la confusión se ha producido principalmente, al considerar equivocadamente que la pared **P1** había sido eliminada durante el tratamiento de las fibras.

Sin embargo, en ninguno de los experimentos realizados en este estudio hemos observado que la **P1** resultase eliminada, ni siquiera en aquellos tratamientos drásticos que degradan la pared secundaria.

Afortunadamente, recientemente se ha demostrado que cuando las fibras se tratan con disolventes o agentes hinchantes, sus paredes **P1** y **S1** presentan mecanismos de hinchamiento y disolución característicos e inconfundibles [35-40]. En el siguiente apartado 6, expondremos la observación mediante microscopía óptica, de los complejos mecanismos de hinchamiento y disolución de la pared celular de las fibras, cuando estas se tratan con agentes disolventes e hinchantes.

## **6.- Estudio de la reactividad de las fibras de albardín mediante microscopía óptica.**

La celulosa de las fibras vegetales resulta poco asequible a los reactivos. Esto es debido, a la compleja estructura de la pared celular, donde la celulosa aparece formando microfibrillas cristalinas embebidas en una matriz amorfá de hemicelulosas y pectinas.

Para mejorar la accesibilidad de los reactivos, las reacciones de modificación de celulosa se realizan casi siempre, sometiendo las fibras a disolución o hinchado, mediante tratamiento con disolventes o agentes hinchantes.

Por consiguiente, el estudio de los mecanismos de hinchado y disolución de las fibras celulósicas presenta gran interés industrial y teórico. Estos mecanismos son complejos, debido precisamente a la complejidad estructural de la pared celular. Afortunadamente, la microscopía óptica resulta adecuada para estudiar estos mecanismos, ya que permite observar los cambios en la estructura morfológica de las fibras como consecuencia de su tratamiento con disolventes y agentes hinchantes.

Cuando las fibras vegetales se tratan con disolventes o agentes hinchantes, giran vivamente, se contraen longitudinalmente y se hinchan, pudiendo aumentar su diámetro de manera espectacular. Se observa que la pared **P1** resulta muy difícil de disolver mientras que las capas interiores de la pared secundaria resultan disueltas en primer lugar. [35-40]

El aumento espectacular del diámetro puede quedar restringido a determinadas zonas localizadas a lo largo de la fibra. En estas zonas, crecen grandes balones esféricos o cilíndricos, que contienen la celulosa disuelta de la capa **S2** retenida por la capa **S1**. Esta última capa, aparece hinchada en forma de membrana elástica. La formación de estos grandes balones se conoce como fenómeno de “ballooming”. [35-46]

Finalmente, la fibra puede permanecer en este estado de hincharse y no disolverse, o los balones se rompen liberando la celulosa disuelta y la fibra puede acabar disolviéndose por completo.

En el siguiente sub-apartado 6.1, se resumen los modelos descritos en la bibliografía [35-46], para la explicación de los fenómenos asociados a los complejos mecanismos de hinchado y disolución de fibras celulósicas nativas, tal y como se observan mediante microscopía óptica. A continuación (en el 6.2), se exponen los modelos particulares que se proponen en este trabajo, como explicación de los fenómenos observados durante el hinchado y disolución de fibras de albardín nativas o modificadas químicamente.

## **6.1.- Mecanismos de hinchado y disolución de fibras celulósicas nativas descritos en la bibliografía.**

La formación de hilos espirales, anillos y collares y el crecimiento de grandes balones son dos de los fenómenos más característicos, asociados al hinchado y disolución de las fibras vegetales nativas, que pueden observarse con el microscopio óptico [35-40]. Mientras que los hilos espirales, anillos y collares son fragmentos de la pared primaria rota y plegada, los balones son zonas (localizadas) especialmente hinchadas de la pared secundaria. Sin embargo, como expondremos a continuación, ambos fenómenos ocurren simultáneamente y están estrechamente relacionados por las diferencias en la solubilidad de las paredes primaria y secundaria.

Además de hincharse irregularmente formando característicos balones, las fibras celulósicas nativas muestran llamativos movimientos de rotación alrededor de su eje y de contracción longitudinal. [37]

Dependiendo de la calidad del disolvente las fibras celulósicas nativas pueden disolverse por fragmentación sin hincharse, hincharse y después disolverse o únicamente permanecer hinchadas sin llegar a disolverse [35, 36]. En el segundo caso, se observa que la celulosa de la capa S2 también se disuelve mediante fragmentación.

Formación de balones, rotación, contracción y fragmentación, todos ellos son fenómenos muy espectaculares, asociados al hinchado y disolución de fibras celulósicas nativas, que pueden observarse detalladamente mediante microscopía óptica. [35-40] Estos serán expuestos con cierto detenimiento en los siguientes apartados:

1º.- Según se describen en la bibliografía [para ciertas fibras celulósicas nativas y algunos de sus derivados (obtenidos heterogéneamente, es decir sin alterar la morfología original de la fibra nativa)] [35-40].

2º.- Según observaciones acumuladas en el laboratorio de Química Orgánica de la EINA durante el estudio de fibras celulósicas nativas y modificadas químicamente, diferentes a las de albardín (principalmente, algodón, cáñamo, lino, rafia y sisal).

### **6.1.1.- Gradiente de solubilidad en la pared celular.**

Como apuntamos en el anterior apartado 5, la pared de las fibras vegetales puede describirse como un composite complejo, formado por láminas concéntricas de rígidas microfibrillas de celulosa del espesor de una microfibrilla ( $\approx 5$  nanómetros), embebidas en una matriz gelificada compuesta principalmente de polisacáridos no celulósicos y pectinas. Estas láminas aparecen compartimentadas en capas que se diferencian en su estructura química y morfológica.

La composición y estructura de las paredes primaria y secundaria son muy diferentes, aunque ambas presenten una disposición helicoidal de sus microfibrillas de celulosa. Su función celular es también muy distinta. La pared **P1** es delgada, pero muy resistente a la tensión y flexión, aun siendo elástica y flexible, puesto que debe de soportar la presión de turgencia, las fuerzas que tienden a separar las fibras adyacentes y además, ser capaz de crecer. Sin embargo, la pared secundaria es muy gruesa (aproximadamente 90% del espesor total) y rígida para poder soportar grandes cargas de compresión sin deformarse.

La pared primaria **P1** se sintetiza durante la fase de extensión o elongación celular. Sin embargo, cuando las fibras (células) dejan de crecer (alargarse), maduran, para poder soportar grandes cargas de compresión, mediante la biodeposición de una gruesa pared secundaria, rígida y resistente. Durante la maduración de la fibra, que puede tardar varios días o semanas, las capas de la gruesa pared secundaria se van depositando secuencialmente sobre la **P1** y hacia el interior (núcleo) de la célula, hasta que el protoplasma prácticamente desaparece.

Recientemente, se ha demostrado que las paredes primaria y secundaria de las fibras vegetales presentan distinta solubilidad, debido a sus diferentes estructuras químicas y morfológicas [39]. La pared primaria resulta más difícil de disolver que la secundaria. De hecho, existe un gradiente radial de solubilidad en la pared celular que aumenta hacia el interior de la fibra. De manera que cuanto más interior es una capa, más fácil de disolver resulta. Es decir, que cuanto más joven es una capa (ósea, cuanto más recientemente fue biodepositada) más fácil resulta su disolución. Probablemente, los dos siguientes factores contribuyen significativamente en la explicación de este hecho: 1.-La menor deformación (orientación) de las capas más interiores durante el alargamiento y engrosamiento de la pared celular y 2.- La menor presencia de polisacáridos no celulosicos en estas capas más jóvenes. [39]

#### **6.1.2.- Rotura de la pared primaria: Formación hilos螺旋ales, anillos y collares.**

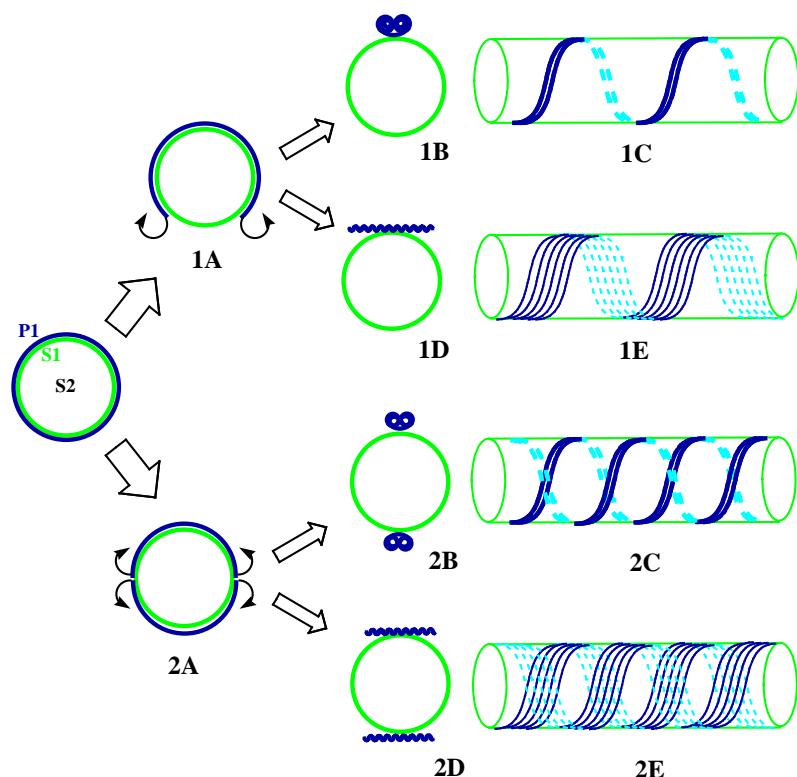
Las capas exteriores son las más insolubles de la pared celular. En particular, la pared **P1** puede resultar muy insoluble en disolventes que disuelven fácilmente la capa **S2**. La insoluble pared exterior **P1**, acaba rompiéndose bajo la presión de la celulosa disuelta de las capas **S2**.

Sin embargo, los fragmentos de la **P1** no se desprenden de la fibra, sino que quedan adheridos en su superficie en forma de gruesos hilos espirales o collares. En especial, cuando la pared primaria se rompe longitudinalmente, forma unos pocos fragmentos alargados en el eje de la fibra, en forma de cintas (generalmente, de una o tres largas cintas). Estas cintas se enrollan sobre sí mismas perpendicularmente al eje de la fibra, formando largos y finos hilos compactos [**Figura 1 (1A-C y 2A-C)**]. Observando la

fibra en el microscopio óptico, estos fragmentos aparecen como gruesos hilos espirales alrededor del eje de la fibra.

La tendencia que muestra la pared **P1** a enrollarse una vez rota es debida a que durante la biodeposición de sus láminas, las exteriores experimentan un mayor alargamiento que las interiores. Durante la biosíntesis de la pared **P1**, las láminas exteriores se depositan en la fase de elongación de la fibra. Sin embargo, las interiores se depositan cuando la fase de elongación de la célula está prácticamente acabada. Por consiguiente, las láminas exteriores resultan sometidas a un mayor alargamiento que las interiores. [39]

Por otra parte, cuando la pared primaria se rompe transversalmente forma fragmentos cilíndricos que se enrollan en el eje de la fibra, generando anillos y collares [Figura 2 y 4]. Observando la fibra en el microscopio óptico, estos fragmentos con forma de anillos y collares aparecen como estrechamientos o estrangulamientos que restringen el hinchado de la pared secundaria. La fibra muestra un característico hinchado heterogéneo, apareciendo como un collar de perlas, donde las perlas se corresponden con los balones (zonas de hinchamiento localizado) y los estrechamientos que unen las perlas se corresponden con los fragmentos de la **P1** con forma de hilos, anillos y collares (zonas de la fibra con bajo hinchamiento). [35-40]



**Figura 1.** Dibujo esquemático del corte transversal de una fibra hinchada con disolvente, mostrando diferentes roturas y plegamientos de la pared primaria **P1**. Arriba, **P1** se rompe longitudinalmente generando un único fragmento (**1A**) que se enrolla sobre sí mismo, formando un grueso hilo helicoidal (**1B** y **1C** vista transversal y longitudinal, respectivamente) o se arruga, formando una cinta helicoidal corrugada (**1D** y **1E**). Abajo, **P1** se rompe longitudinalmente generando dos fragmentos (**2A**) que se enrollan formando dos hilos gruesos (**2B** y **2C** vista transversal y longitudinal, respectivamente) y dos cintas corrugadas (**2D** y **2E**).

### 6.1.3.- Formación de balones.

El hinchado irregular de las fibras celulósicas nativas ha sido observado desde muy antiguo [41-46]. El fenómeno de “ballooming” se ha explicado como la rotura de la pared primaria causado por el hinchado de la pared secundaria. Los fragmentos de la **P1** se pliegan formando hilos, anillos y collares. Estos fragmentos originan balones al restringir la expansión uniforme de la pared secundaria [41-46].

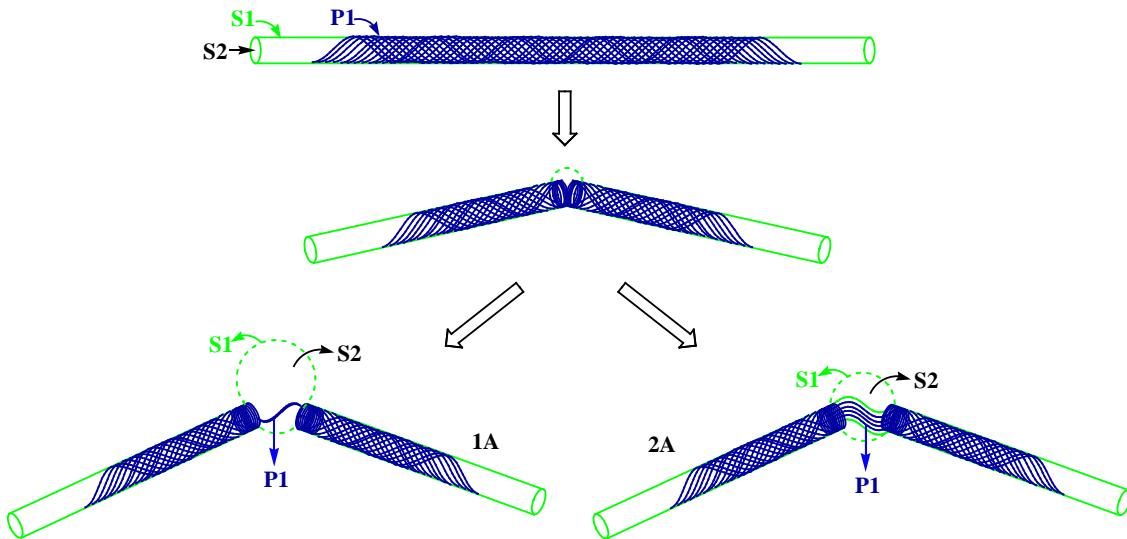
Recientemente, este fenómeno ha sido explicado más detalladamente [35-40], como una consecuencia de la existencia de un gradiente de solubilidad radial y centrípeto, en el interior de la fibra. De manera que las capas exteriores (**P1** y **S1**) son más insolubles que la más interior **S2**. Un balón se considera formado por la capa **S1** sin disolver, pero hinchada como una membrana elástica que encierra a la celulosa disuelta de la capa **S2**. El balón está limitado por los fragmentos de la capa más insoluble (la **P1**), dos anillos o collares unidos por un grueso hilo helicoidal que rodea al balón [Fig. 2 (1A), Fig. 3 (1A y 1B) y Fig. 4 (2B)].

El disolvente penetra en la fibra a través de la pared **P1** que resulta poco soluble y extensible, pero permeable al disolvente. La **S1** más soluble y extensible que la **P1**, se hincha formando una delgada membrana elástica. La capa **S2** se disuelve provocando el hincharamiento transversal de la membrana **S1**.

Bajo la presión de la membrana **S1**, la pared **P1** se rompe y se pliega (enrollándose) formando fragmentos en forma de hilos, anillos y collares que limitan o impiden el hincharamiento de **S1**. Debido al gran hincharamiento experimentado por la **S1**, aparecen los balones a través de las ranuras de la **P1**, quedando localizados entre los fragmentos de esta pared [Fig. 2 (1A), Fig. 3 (1A y 1B) y Fig. 4 (2B)].

Finalmente, la fibra puede quedar en este estado de hincharamiento (caracterizado por la presencia de balones) y no disolverse. O por el contrario, la membrana **S1** se rompe liberando la celulosa disuelta y dejando los restos de la **P1** que acaban disolviéndose también, pero después de que se hayan disuelto los fragmentos de **S1** [Fig. 3 (1C) y Fig. 4 (2C)].

Como se ha expuesto en el apartado anterior 6.2.1, la **P1** genera fragmentos con forma de collares cuando se rompe transversalmente a lo largo de la circunferencia de la fibra, mientras que si su rotura es longitudinal origina hilos o anillos.



**Figura 2.** Dibujo que muestra esquemáticamente la secuencia de la rotura transversal de la pared primaria **P1**, con formación de un balón esférico. El balón está formado por la capa **S1**, hinchada como una membrana elástica, que encierra a la celulosa disuelta de la capa **S2**. El balón queda limitado por los fragmentos de la pared **P1**, dos anillos o collares unidos por un hilo (**1A**) o cinta helicoidales (**2A**) que rodean la superficie del balón.

#### 6.1.4.- Clasificación de los mecanismos de hinchado y disolución en función de la naturaleza del disolvente.

Las fibras celulósicas nativas se hinchan según diferentes mecanismos característicos, cuando son tratadas con disolventes o agentes hinchantes, pudiendo llegar a disolverse por completo. De acuerdo con la bibliografía, estos mecanismos se pueden clasificar en función de la naturaleza del disolvente en los cinco modos siguientes [35-39], que se exponen según orden decreciente de la calidad del disolvente:

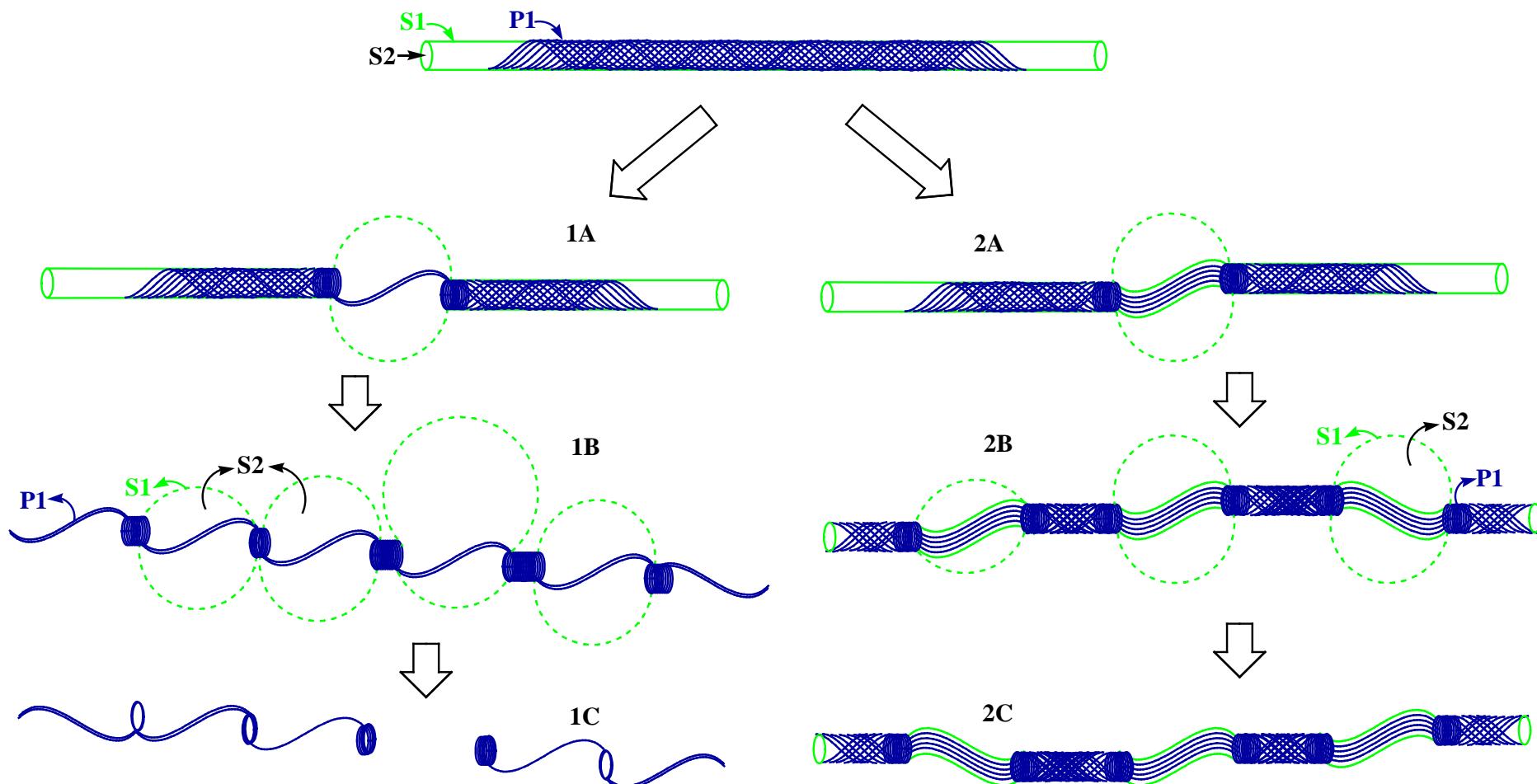
**1.-Disolvente bueno;** la fibra se disuelve mediante fragmentación (se desintegra directa y rápidamente en pequeños fragmentos con forma de aguja o varilla, que acaban disolviéndose por completo).

**2.-Disolvente mediocre-bueno;** la fibra se hincha considerablemente pero de manera irregular, apareciendo hinchamientos esféricos (balones) en determinadas zonas a lo largo de la fibra. Estos balones acaban rompiéndose y la fibra disolviéndose.

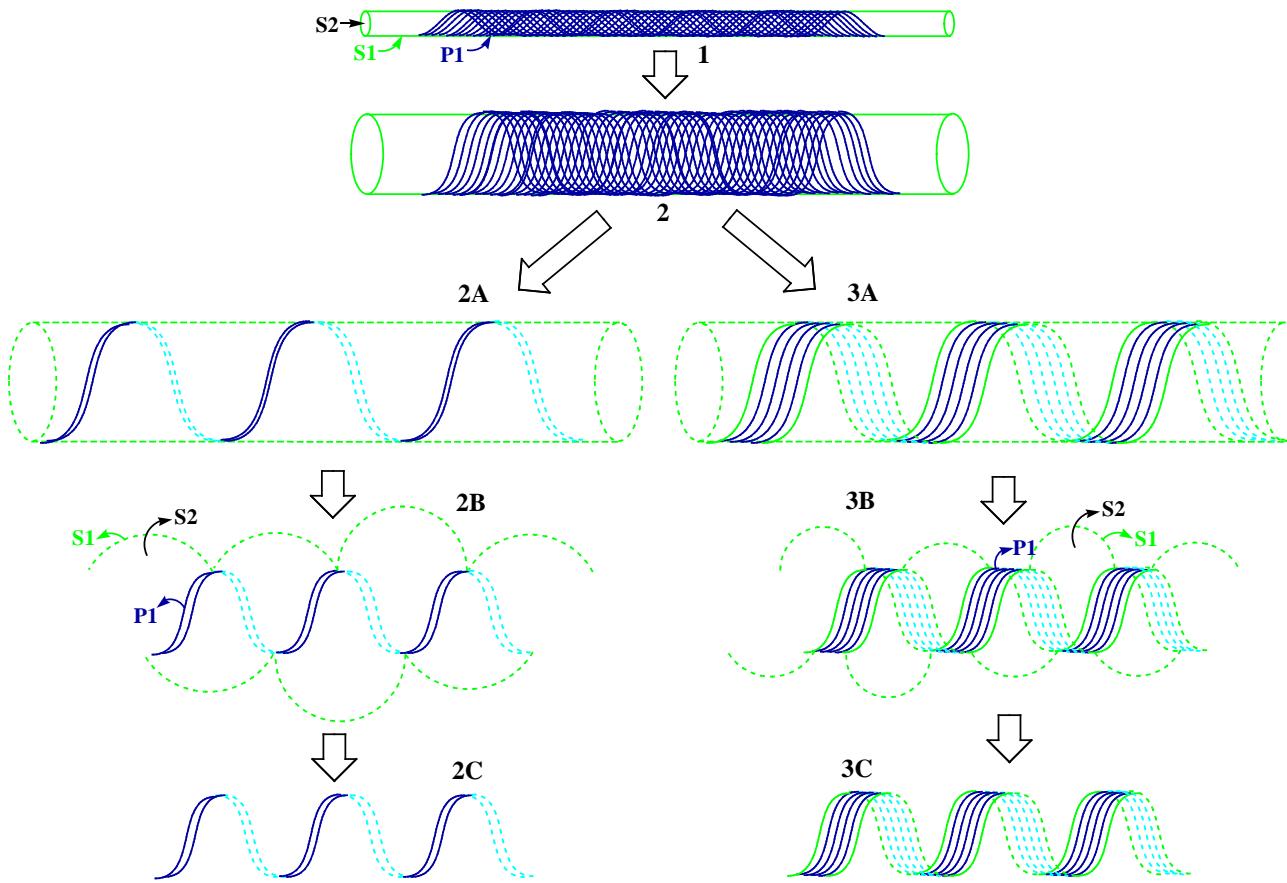
**3.-Disolvente mediocre-malo;** ocurre como en el caso anterior, pero los balones no se rompen y la fibra no se disuelve.

**4.-Disolvente malo;** la fibra se hincha homogéneamente y no llega a disolverse.

**5.-Disolvente muy malo (no disolvente);** la fibra no se hincha y no se disuelve.



**Figura 3.** Representación esquemática de la secuencia de hinchado y disolución de una fibra vegetal con formación de balones separados por hilos o cintas helicoidales, anillos y collares. El hinchado de la pared secundaria de la fibra 1 provoca la rotura transversal de su **P1**, que forma collares unidos por un hilo o una cinta corrugada helicoidal, rodeando los balones (**1A-1B** y **2A-2B**, respectivamente). Finalmente, la hinchada capa **S1** se rompe liberando la celulosa disuelta de la capa **S2**, dejando sin disolver anillos y collares unidos por hilos espirales (**1C**) o cintas (**2C**).



**Figura 4.** Representación esquemática de la secuencia de hinchado y disolución de una fibra vegetal con formación de balones separados por hilos o cintas helicoidales. El hinchado de la pared secundaria de la fibra 1 provoca la rotura longitudinal de su P1 que forma una cinta corrugada dispuesta helicoidalmente alrededor de la S1 hinchada (2). Mientras la S1 continua hinchándose transversalmente, la P1 puede plegarse para formar un grueso hilo helicoidal (2A) o mantenerse como cinta corrugada (3A). Los balones aparecen como consecuencia del gran hinchamiento de la S1 y la restricción impuesta a su hinchado por el hilo o la cinta helicoidales (2B y 3B, respectivamente). Finalmente, la S1 se rompe liberando la celulosa disuelta de la S2, dejando sin disolver un grueso hilo o una cinta helicoidales (2C y 3C, respectivamente).

Los agentes del primer tipo son disolventes, los del segundo tipo son disolventes y agentes hinchantes, mientras que los 3 y 4 son únicamente agentes hinchantes.

Los disolventes buenos no permiten observar el mecanismo de disolución de la fibra, debido a que normalmente sin hinchar la fibra, producen su rápida desintegración y disolución. Sin embargo, los disolventes mediocres hinchan la fibra lentamente e incluso pueden llegar a disolverla, de manera que los procesos de hinchado y disolución pueden observarse detalladamente.

Afortunadamente, la mayoría de los disolventes y reactivos empleados en este estudio se comportan como mediocres y por tanto, permiten observar detalladamente todos los fenómenos asociados al hinchado y disolución de las fibras de albardín.

#### **6.1.5.- Fragmentación de las fibras celulósicas nativas.**

Fragmentación es el mecanismo de disolución en el que se disuelven las partes más débiles de la pared celular, quedando fragmentos sólidos sin disolver, alargados axialmente y fuertemente birrefringentes.

La fragmentación se produce sin hinchado de la fibra, cuando esta se desintegra en disolventes buenos. Los disolventes mediocres disuelven la celulosa del interior de los balones mediante fragmentación. En el primer caso, la fibra se desintegra rápidamente en fragmentos alargados (con forma de agujas o varillas) que finalmente se disuelven por completo. En el segundo caso, los alargados fragmentos aparecen en el interior de los balones como restos sin disolver de las capas de la pared **S2**. Debido a la contracción axial de la fibra, estos fragmentos sólidos, que en un principio aparecen orientados en el eje de la fibra, adoptan una característica disposición en zigzag a lo largo de la fibra.

La fragmentación se debe a la existencia de zonas débiles que facilitan la penetración y difusión del disolvente en el interior de la fibra. El hecho de que los fragmentos resulten alargados en el eje de la fibra, indica que estas zonas débiles no son únicamente las dislocaciones de la fibra, sino que además existen poros o zonas amorfas que se extienden a lo largo de la fibra. El hecho de que estos fragmentos aparezcan fuertemente birrefringentes indica que deben de ser cristalinos. Como las zonas amorfas de la celulosa de la pared celular se disuelven más lentamente que las cristalinas, el hecho de que los fragmentos cristalinos resulten alargados en la dirección de la fibra indica que las zonas débiles amorfas se extienden a lo largo de la fibra. [37-39]

#### **6.1.6.- Contracción de fibras celulósicas nativas.**

La contracción axial de las fibras celulósicas nativas durante su hinchado y disolución es otro fenómeno asociado, muy aparente, tanto si se observa con el microscopio óptico o macroscópicamente.

Contracción y rotación aumentan con el grado de hinchamiento de la fibra. Por un lado, los disolventes buenos producen la rápida desintegración y disolución de la fibra sin permitir observar estos fenómenos. Los agentes hinchantes solo provocan pequeñas contracciones y rotaciones. Son los disolventes mediocres, los que ocasionan las mayores rotaciones y contracciones de la fibra, observables detenidamente con el microscopio óptico. [39]

Las capas interiores se contraen de manera distinta a las exteriores. Esta diferente contracción, puede llegar a ocasionar una completa separación entre capas interiores y exteriores, dando la falsa impresión de que en el interior de la fibra existe otra fibra (cuando este fenómeno se observa con el microscopio óptico). Debido a esta diferente contracción, los elementos del interior de la fibra orientados axialmente (canal del lumen, capas internas de la pared S2 y fragmentos alargados sin disolver de la S2), adoptan una disposición plegada en zigzag [45], llegando en algunas ocasiones a invertir la orientación inicial, produciendo grandes bultos, que pueden llegar a convertirse en ramas laterales y provocar bifurcaciones en forma de Y falsas.

La disminución de la longitud de la fibra es observable macroscópicamente. Además, si se impide la contracción de la fibra (por ejemplo, aplicando una tensión en sus extremos) su solubilidad y reactividad disminuyen drásticamente.

La contracción es debida a la relajación de la conformación extendida de las cadenas de celulosa. Durante la biodeposición de la pared celular, las cadenas de celulosa se depositan con una conformación extendida en microfibrillas cristalinas. El hinchado de las microfibrillas aumenta la libertad conformacional de las cadenas, permitiéndoles adoptar una conformación menos extendida, más próxima a la conformación de equilibrio. La conformación adoptada finalmente, depende del disolvente o agente hinchante. Gracias a la red de puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa, la relajación conformacional de cada cadena, se traduce en una contracción macroscópica de la fibra. [39]

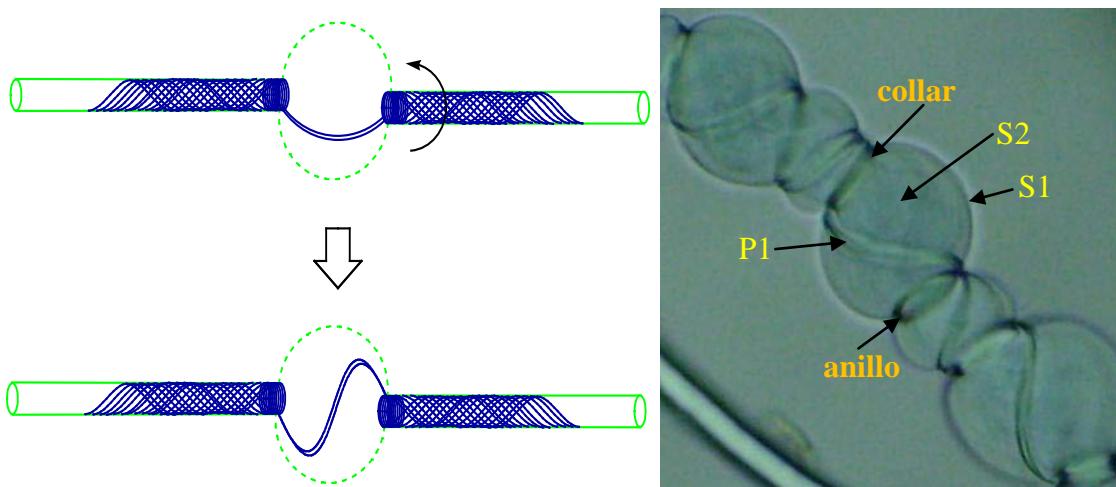
#### **6.1.7.- Rotación de las fibras celulósicas nativas.**

Cuando algunas fibras celulósicas nativas entran en contacto con un disolvente, rotan y se contraen realizando sorprendentes movimientos muy vivos (tipo twisting). [43]

Durante el hinchado y disolución de la capa **S2** de algunas fibras celulósicas nativas se observa una rotación “microscópica”. Esta micro-rotación, es la causante de que los fragmentos de la **P1** con forma de hilo que unen los collares limitantes de un balón, no aparezcan rodeando al balón con una disposición lineal, sino que lo rodean helicoidalmente [Fig. 5]. [39]

Sin embargo, la observación de estos hilos helicoidales alrededor de los balones no implica necesariamente que la fibra haya rotado durante su hinchado. Esto es debido a que la disposición helicoidal de los fragmentos de la **P1**, puede producirse también sin necesidad de rotación. Esto ocurre, cuando dos balones crecen juntos pero en direcciones opuestas, debido a la rotura de la **P1** en dos puntos diametralmente opuestos. Entonces, los fragmentos de **P1** entre los balones se pliegan en forma de hilos que quedan dispuestos helicoidalmente [Fig. 4 (2B)]. [39]

Las fibras celulósicas regeneradas no muestran este fenómeno de rotación y las de madera únicamente pequeñas microrotaciones. Se desconoce el motivo por el cual algunas fibras celulósicas nativas rotan durante su hinchado y disolución. [39]



**Figura 5.** Dibujo esquemático a la derecha: Sobre la superficie de un balón, un fragmento de la **P1** con forma de hilo queda dispuesto helicoidalmente mediante microrotación. (Arriba, el hilo rodea al balón linealmente) Uno de los collares que limitan el balón gira axialmente 180°, mientras el otro permanece inmóvil. (Abajo) Como consecuencia del giro, el hilo queda rodeando al balón helicoidalmente. A la izquierda, microfotografía de una fibra de albardín en cuoxam, donde puede apreciarse la disposición helicoidal de los gruesos hilos que rodean a los balones (fibra de albardín deslignificada normalmente y tratada con cuoxam 1M).

## 6.2.- Mecanismos de hinchado y disolución de fibras de albardín nativas y modificadas.

Las fibras de albardín (nativas y modificadas) que hemos observado durante este estudio, muestran los mismos comportamientos durante su hinchado y disolución que

los correspondientes descritos en la bibliografía [35-39], para otras fibras celulósicas nativas y modificadas (ver 6.1). Es decir, en contacto con disolventes mediocres, rotan, se contraen e hinchan irregularmente, adoptando una morfología balonada (formación de balones separados por anillos o collares y rodeados por hilos helicoidales).

Sin embargo, también hemos observado que las fibras de albardín pueden mostrar otros comportamientos diferentes, no descritos en la bibliografía. Esto ocurre especialmente, cuando la modificación química de la fibra produce un incremento del gradiente de solubilidad de las capas la pared celular, en el sentido de aumentar la insolubilidad de las capas exteriores y en particular, la insolubilidad de la pared **P1**. Las fibras con la pared **P1** modificada se hinchan y disuelven mediante ballooning diferente del convencional de las fibras de albardín nativas. La principal diferencia consiste en que la pared **P1** modificada no muestra el característico plegado (enrollado) de la **P1** nativa [**Fig. 1**].

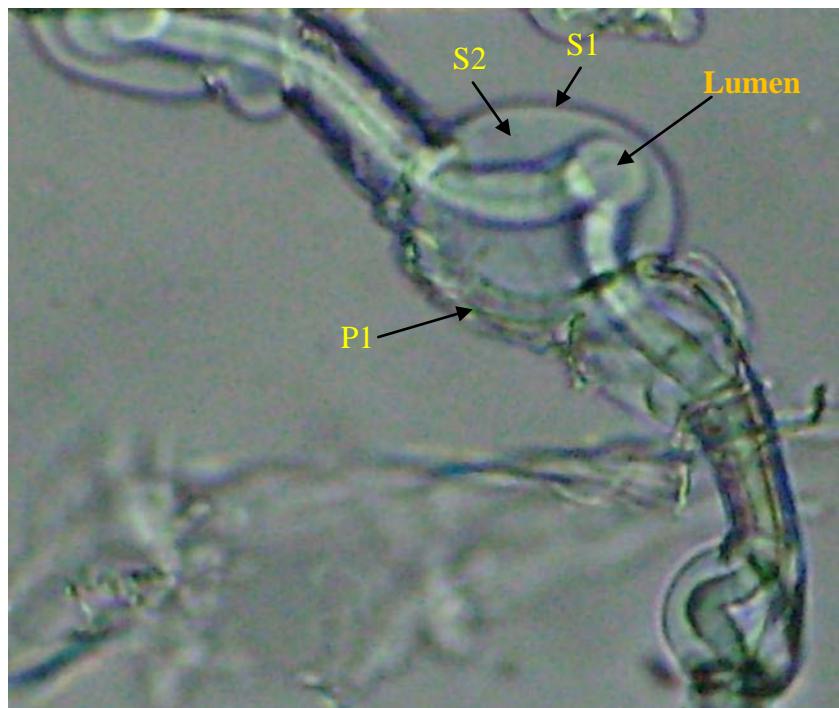
Durante ballooning de las fibras de albardín, la pared **P1** modificada se rompe como la nativa, pero no se pliega sobre sí misma originando hilos (como ocurre en la nativa), sino que simplemente se arruga formando una cinta corrugada [**Fig. 2 (2A)**, **Fig. 3 (2A y 2B)** y **Fig. 4 (3A y 3B)**]. Este **ballooning no convencional** de las fibras con la **P1** modificada, ocurre en los mismos disolventes mediocres que hinchan y disuelven mediante ballooning convencional la fibra nativa.

Además de ballooning no convencional en disolventes mediocres, las fibras de albardín con la **P1** modificada muestran **ballooning localizado en algunas dislocaciones** [**Fig. X**], cuando se tratan con disolventes muy malos (no disolventes), en los que las fibras nativas tan apenas se hinchan apreciablemente o no interaccionan en absoluto.

#### **6.2.1.- Introducción: Observación microscópica de las fibras de albardín.**

La microscopía óptica nos ha permitido seguir directamente los espectaculares mecanismos de hinchado y disolución de las fibras de albardín. A medida que las fibras se hinchan, se deforman enormemente, aumentando su diámetro hasta un orden de magnitud y volviéndose completamente transparentes, lo que permite observar detalladamente, algunos aspectos de su morfología interna (si bien distorsionada).

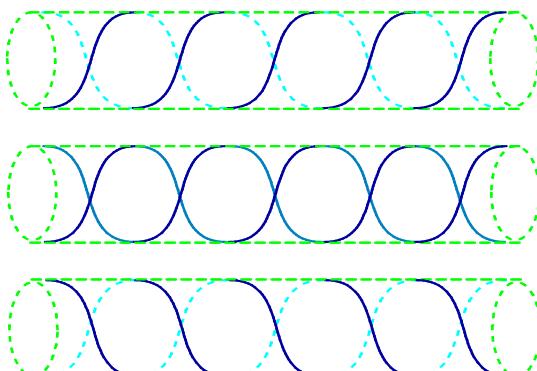
Sin embargo, las fibras de albardín presentan pequeños tamaños y por consiguiente, determinados elementos de su morfología interna no se aprecian con tanto detalle como en otras fibras de mayor tamaño (como algodón, lino y cáñamo). En particular, por este motivo, las capas individualizadas de la pared **S2**, la capa **S3** y el canal del lumen de las fibras de albardín no se describirán con detalle en este estudio. Tampoco se discutirá la existencia de la posible formación de balones localizados en alguna de estas capas (**microfotografía 25**).



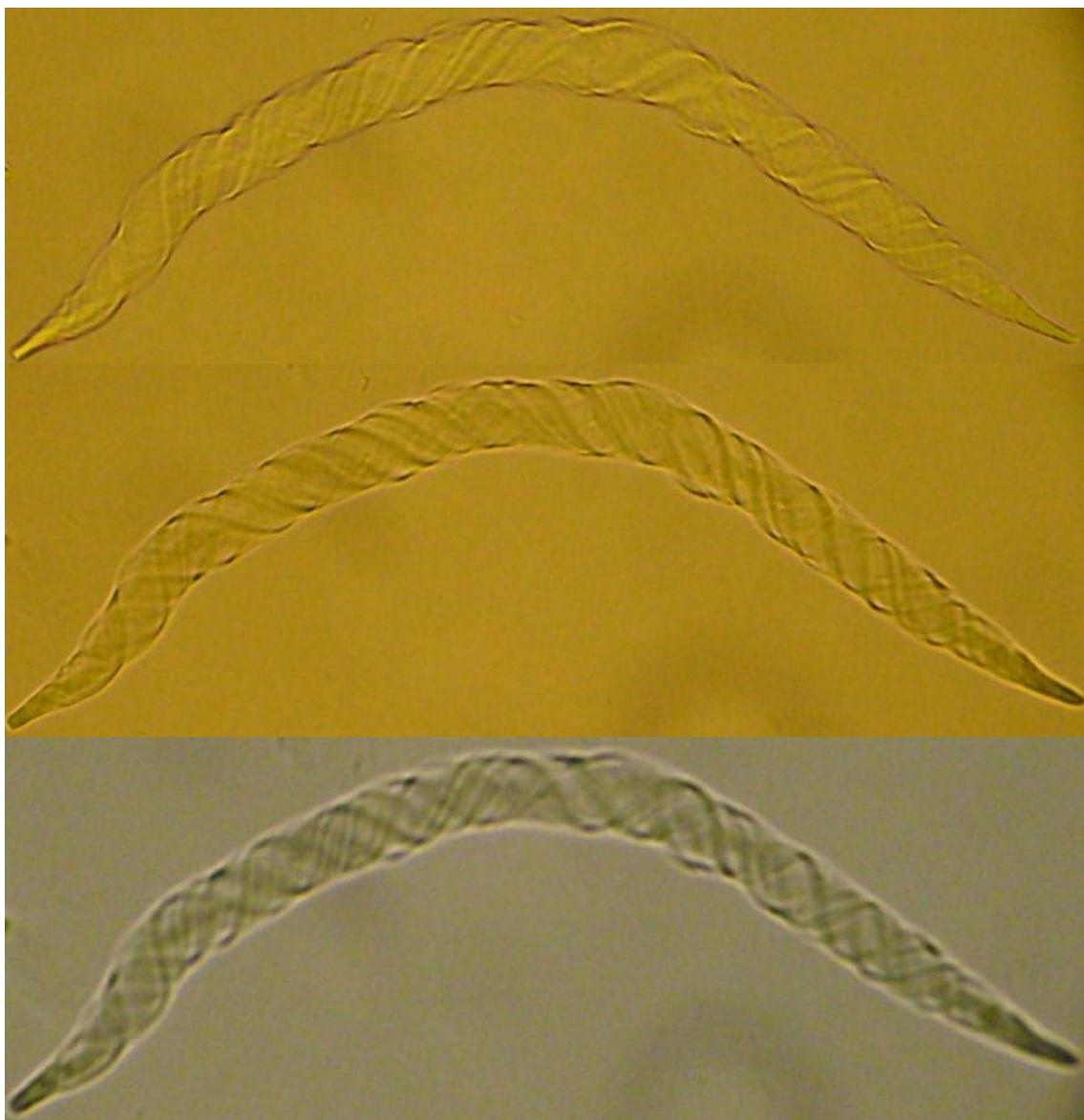
**Microfotografía 25.** (200X) Aparente formación de un pequeño balón en el canal del lumen, dentro de otro balón de las capas **S2** y **S1** y la pared **P1**. Fibra de albardín acetilada superficialmente e hinchada con cuoxam 1M.

Por otro lado, la transparencia alcanzada por las fibras de albardín hinchadas puede ser de tal magnitud que permita observar nítidamente todas las fibras de una pila de varias fibras superpuestas (apiladas). Obviamente, esta transparencia puede inducir a confusión fácilmente. Aunque se observen fibras de albardín completamente aisladas, es fácil confundir la localización de sus elementos exteriores con interiores.

Afortunadamente, incluso las fibras de albardín más pequeñas alcanzan al hincharse un diámetro suficiente, como para poder enfocar nítidamente el objetivo del microscopio en la superficie (superior e inferior) y en el interior de la fibra. Por ejemplo, los fragmentos de la **P1** plegados con forma de hilos helicoidales que aparecen dispuestos como una hélice **S** en la superficie superior de la fibra, aparecen según una hélice opuesta **Z** en la superficie inferior y como una doble hélice en el interior de la fibra [Fig. 6] y microfotografía 26.



**Figura 6.** Representación esquemática de los fragmentos helicoidales de la **P1** en una fibra de albardín hinchada y completamente transparente. Arriba, los hilos aparecen dispuestos según una hélice **S** (en la superficie superior de la fibra), en el centro, según una doble hélice (interior de la fibra) y abajo, según una hélice **Z** (superficie inferior de la fibra).



**Microfotografía 26** (200X), Pequeña fibra de albardín (200  $\mu\text{m}$ ) acetilada e hinchada homogéneamente con 1,4-dioxano a 90°C. De arriba abajo; Enfocando en la superficie inferior, en la superficie superior y en el interior de la fibra, los fragmentos de la **P1** aparecen según una hélice S, hélice Z y doble hélice, respectivamente.

#### 6.2.2.- Gradiente de solubilidad en la pared celular: Insolubilidad de la pared P1.

Hemos podido comprobar durante el desarrollo de todo este trabajo, que las fibras de albardín, al igual que otras fibras celulósicas nativas (ver 6.1.1), también presentan un gradiente radial y centrípeto en la capacidad de disolución de las diferentes capas de su pared celular. De manera que las capas interiores resultan más fácilmente solubles que las exteriores, apareciendo la pared **P1** como mucho más insoluble que las demás. Resulta frecuente observar grandes fragmentos de **P1** o incluso esta pared entera y aparentemente intacta, cuando el resto de la fibra de albardín se ha disuelto por completo.

La modificación del gradiente de solubilidad de la pared celular la realizamos mediante modificación química selectiva de sus diferentes capas. En particular, incrementando la diferencia de solubilidad entre la pared **P1** y la capa **S2** (aumentando la insolubilidad de la **P1** y/o la solubilidad de la **S2**). Por ejemplo, acetilando selectivamente la pared **P1** o degradando selectivamente la pared secundaria.

La celulosa acetilada presenta una solubilidad muy diferente de la celulosa. Por consiguiente, disolventes que fácilmente pueden disolver la capa **S2** sin acetilar, ni siquiera hinchan apreciablemente la pared **P1** acetilada. Esto causa que durante el hinchado irregular de las fibras, los fragmentos de la **P1** acetilada no se plieguen normalmente y por tanto que los balones aparezcan rodeados de una cinta corrugada insoluble.

Por el contrario, otros disolventes que fácilmente disuelven la pared **P1** acetilada, únicamente producen un ligero hinchamiento en la pared secundaria sin acetilar. En este caso aparecen pequeños balones localizados en las dislocaciones más severas.

La pared **P1** de las fibras de albardín resulta más resistente a ácidos y bases que la pared secundaria. Aparentemente, el tratamiento con ácidos fuertes produce una mayor degradación de la pared secundaria que de la pared **P1**. Consecuentemente, la pared secundaria degradada aparece como mucho más soluble que la primaria.

#### **6.2.3.- Rotura de la pared primaria: Formación cintas corrugadas.**

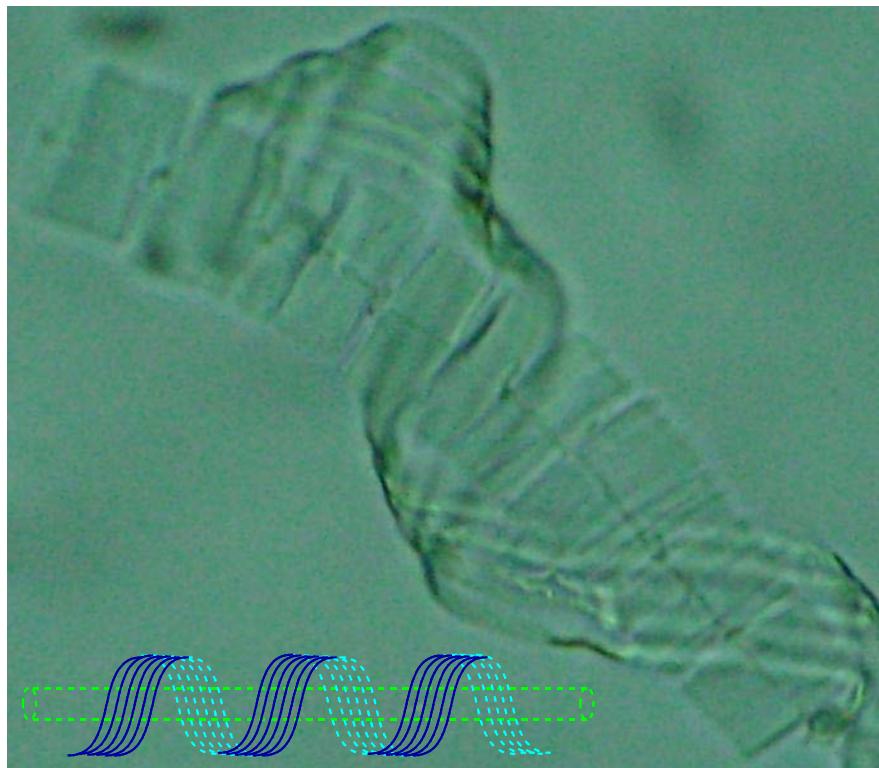
Cuando las fibras de albardín nativas se hinchan y disuelven en cuoxam 1M, muestran el mismo fenómeno de ballooning descrito en la bibliografía, para otras fibras celulósicas nativas. La **P1** se rompe y los fragmentos se pliegan (enrollándose sobre sí mismos) formando hilos y collares que originan estrangulamientos en la fibra hinchada. Sin embargo, en las fibras tratadas con ácidos y bases y en las acetiladas superficialmente, muchos fragmentos de la **P1** modificada no se pliegan como la nativa, sino que mantienen la forma original de cinta corrugada o banda a rayas.

En algunas fibras, de muestras sometidas a tratamientos drásticos con ácidos y bases durante su aislamiento, es posible observar que los fragmentos de **P1** no se enrollan sobre sí mismos, sino que forman anchas cintas corrugadas. Además, estas cintas helicoidales suelen desprenderse de las fibras. También es muy frecuente que queden sueltas, únicamente unidas a las fibras por sus extremos, sin formar estrangulamientos. En ocasiones, en estos casos puede observarse que la pared secundaria aparece fragmentada (microfotografías 27, 37). Este hecho indica que la pared primaria también puede presentar cierto grado de degradación, aunque no aparezca dañada (en el microscopio óptico).

Por otra parte, en las fibras con la **P1** acetilada selectivamente (superficialmente), únicamente se observan fragmentos coarrugados de la **P1**, no se observa ninguno plegado formando gruesos hilos. Estas cintas corrugadas no se desprenden de las fibras sino que quedan dispuestas helicoidalmente alrededor de la pared secundaria hinchada.

El cuoxam hincha y disuelve la celulosa pero no interacciona tan apenas con la celulosa acetilada. No hincha la **P1** modificada tan eficazmente como la nativa y por tanto, la primera únicamente puede arrugarse. En las fibras completamente acetiladas e hinchadas con 1,4-dioxano, la **P1** se pliega normalmente (enrollándose sobre sí misma), puesto que este disolvente hincha y disuelve la celulosa acetilada mucho mejor que cuoxam.

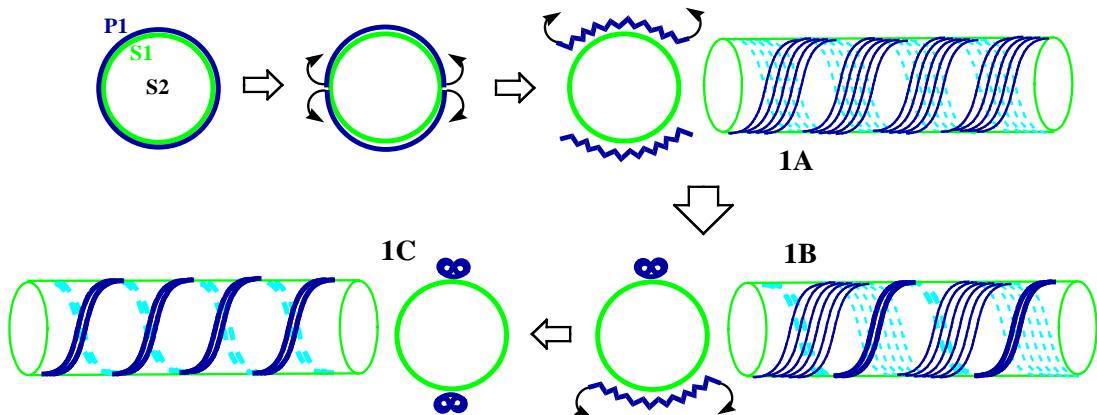
En resumen, a diferencia de los fragmentos de la **P1** nativa, los de la **P1** acetilada selectivamente y los de la **P1** degradada no se pliegan, sino que forman cintas corrugadas. Además, los de la **P1** degradada muestran tendencia a desprenderse de la fibra.



**Microfotografía 27** (200X), Fragmento de pared **P1** dispuesto como una cinta helicoidal suelta alrededor de la pared secundaria fragmentada en discos (representación esquemática en el dibujo al margen). [Fibra de albardín macerada con ác. sulfúrico (38%, 10h a 25°C), acetilada superficialmente y finalmente hinchada con cuoxam 1M].

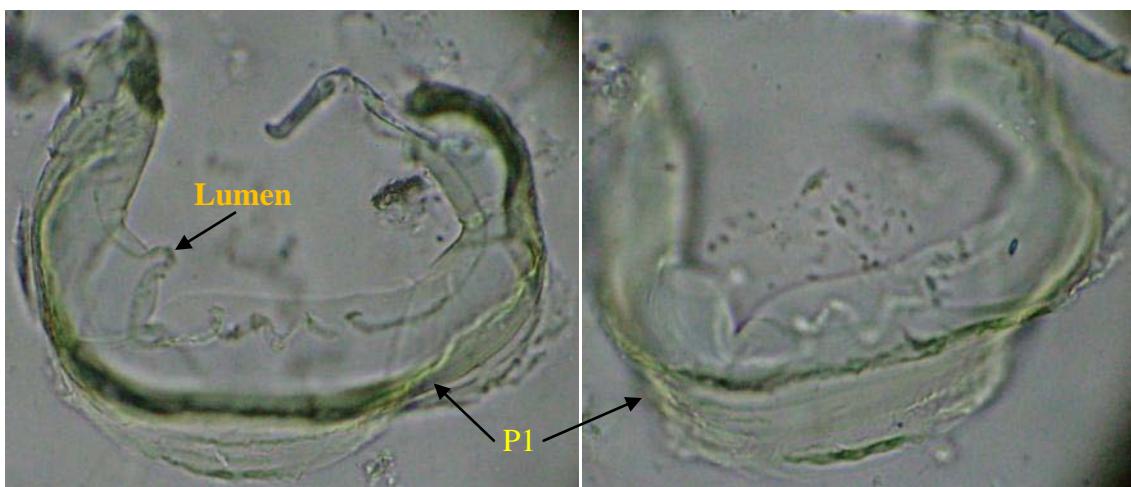
Los fragmentos de la pared **P1** modificada, incapaces de plegarse, aparecen como cintas o bandas transparentes recorridos por arrugas (como hilos) longitudinales perfectamente paralelas en toda su longitud. Muy posiblemente, estas arrugas son una gran parte de los hilos helicoidales que caracterizan a la **P1** en las fibras hinchadas homogéneamente.

Una de las características más aparentes de las fibras hinchadas regularmente, es que aparecen cubiertas por un gran número de hilos helicoidales de diferentes grosores. Probablemente, los fragmentos de la **P1** se arrugan en primer lugar, apareciendo como múltiples hilos helicoidales finos. Bajo la presión de la capa **S1**, estos fragmentos se van plegando (enrollándose sobre sí mismos) generando hilos helicoidales más gruesos [Fig. 7]. Los hilos helicoidales más finos, son originados por las microfibrillas helicoidales de la capa **S1** (tan delgados que son muy difíciles de apreciar en las microfotografías).



**Figura 7.** Modelado del plegamiento de la pared **P1** con formación de hilos de distinto grosor. La pared **P1** se rompe longitudinalmente, generando dos fragmentos arrugados que aparecen como múltiples hilos helicoidales finos (**1A**). Uno de los fragmentos se enrolla sobre sí mismo, formando un grueso hilo helicoidal (**1B**). Finalmente, el otro fragmento también se pliega para formar más hilos gruesos (**1C**). (Los hilos más finos de la **S1** no se muestran).

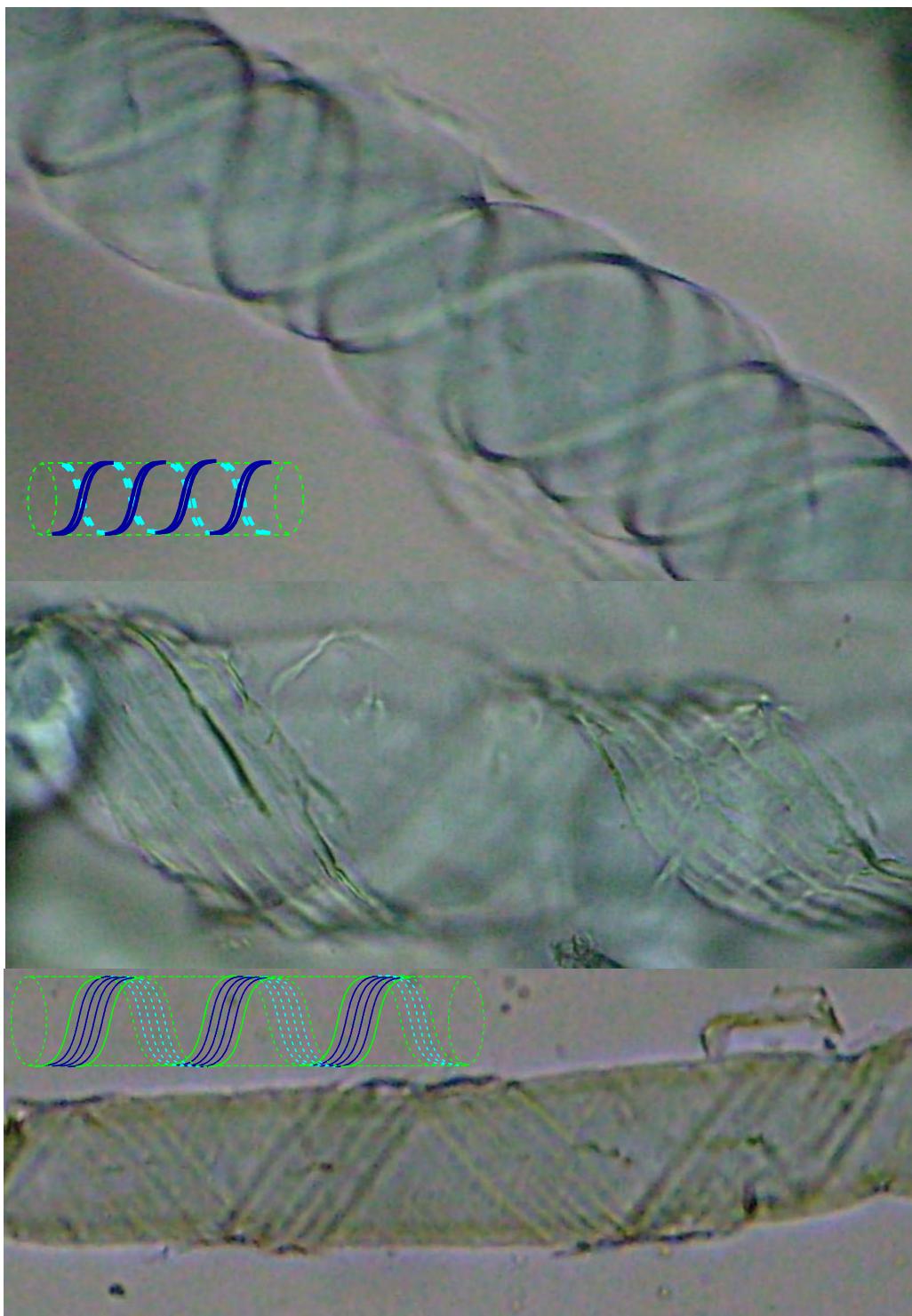
Las siguientes microfotografías 28 a 37 muestran detalles de largos fragmentos de paredes **P1**, plegados o corrugados con forma de gruesos hilos helicoidales o cintas corrugadas, respectivamente.



**Microfotografía 28** (200X), Rotura completa longitudinal de una pared **P1** modificada, generando un único fragmento rígido (no se pliega) con forma de banda a rayas, dispuesto como si se tratase de la columna vertebral de la fibra. Foto izquierda, enfocada en el centro de la fibra. Foto derecha, enfocada en la pared **P1**. (Pequeña fibra de albardín (100 µm) acetilada superficialmente e hinchada con cuoxam).



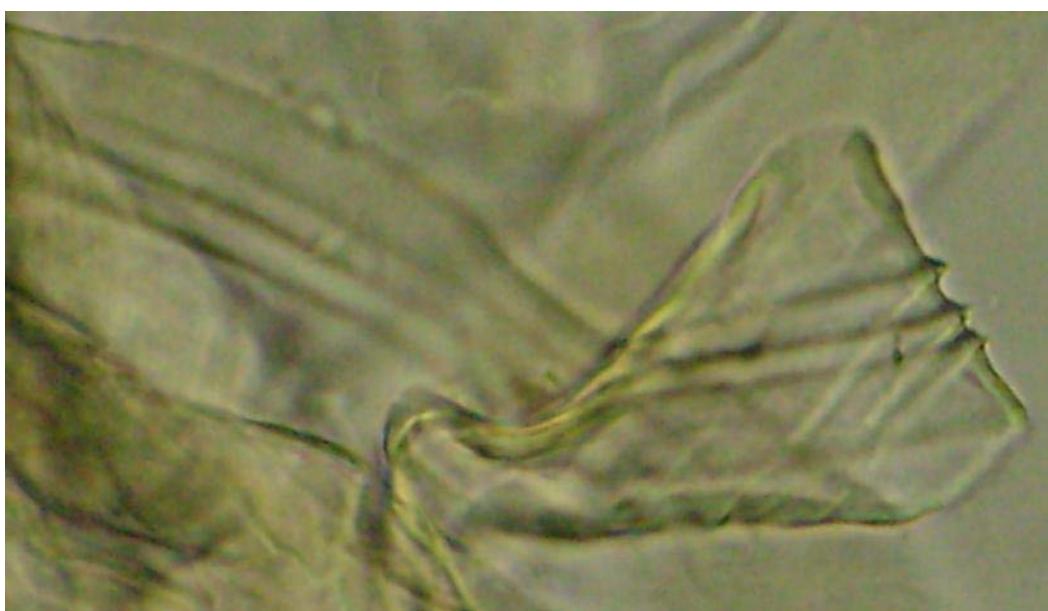
**Microfotografías 29 y 30 (200X)** Fibras de albardín con la **P1** rota formando cintas corrugadas bajo las cuales, pueden apreciarse los hilos helicoidales muy finos de las microfibrillas de la capa **S1**. (Fibras acetiladas con I<sub>2</sub> y tratadas con 1,4-dioxano 90°C).

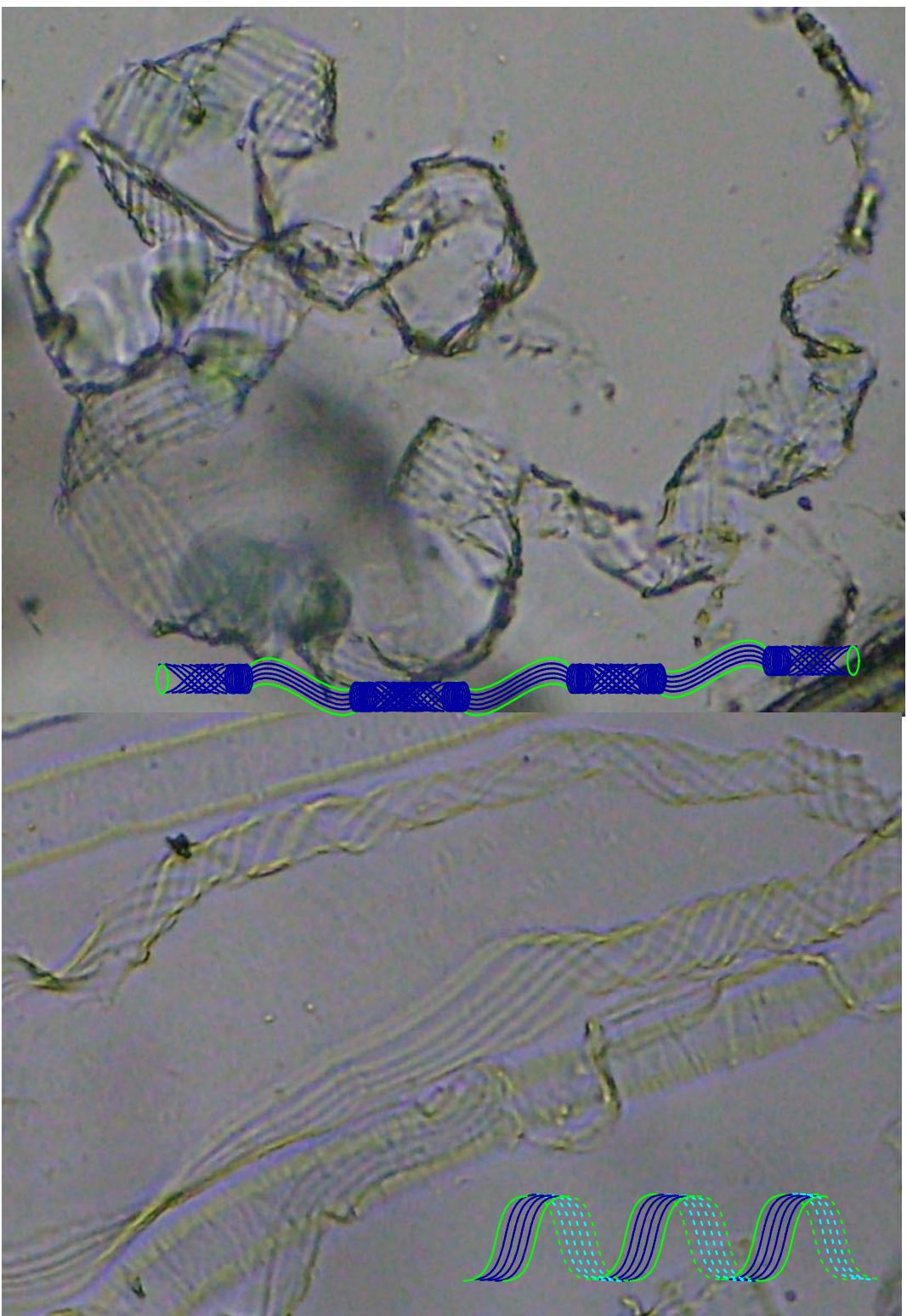


**Microfotografía 31, 32 y 33** (200X), Rotura de la pared **P1** de fibras de albardín hinchadas homogéneamente con cuoxam. Arriba, la **P1** de una fibra nativa rota y plegada formado dos gruesos hilos helicoidales (representados esquemáticamente en el dibujo al margen). Centro y abajo, largos fragmentos insolubles de paredes **P1** de dos fibras acetiladas superficialmente, formado una ancha cinta corrugada helicoidal (representados esquemáticamente en el dibujo central).



**Microfotografías 34 y 35** (300X) muestran detalles de fragmentos de la pared **P1** desprendidos de fibras de albardín acetiladas con I<sub>2</sub> (cat.) y tratadas con 1,4-dioxano 90°C. Puede observarse claramente, que los fragmentos aparecen como cintas corrugadas o bandas rayadas. Especialmente en la foto inferior, puede apreciarse las rayas de las bandas como coarrugas longitudinales perfectamente paralelas. El proceso de acetilación con yodo causa que los fragmentos de la **P1** se desprendan de algunas fibras y queden sin plegarse. Sin embargo, cuando las fibras de albardín acetiladas normalmente se hinchan con 1,4-dioxano 90°C, los fragmentos de la **P1** no se desprenden, sino que se pliegan, para formar gruesos hilos que quedan estrechamente dispuestos como espirales alrededor de la fibra.





**Microfotografías 36 y 37** (100X) Restos completamente insolubles de largos fragmentos de paredes **P1** y paredes **P1** enteras, de fibras de albardín disueltas en cuoxam. Los dibujos esquemáticos al margen representan la forma de los fragmentos, similares a largas cintas helicoidales corrugadas (abajo) y cintas helicoidales uniendo pequeños collares (arriba). [Fibras acetiladas superficialmente (arriba) y fibras Mercerizadas y blanqueadas con tratamiento ácido  $H_2O_2$  30% y ác. acético glacial (abajo)].

#### **6.2.4.- Formación de balones: Ballooning no convencional, ballooning localizado en algunas dislocaciones y ballooning de células asociadas a las fibras de albardín.**

Las fibras de albardín deslignificadas normalmente, y las acetiladas normalmente muestran el fenómeno convencional de ballooning cuando se hinchan con cuoxam y 1,4-dioxano 90°C, respectivamente. Ambas forman balones separados por collares y rodeados por gruesos hilos helicoidales.

Sin embargo, las fibras acetiladas superficialmente (con la **P1** acetilada selectivamente), muestran un fenómeno de ballooning inusual (no convencional), cuando se hinchan con cuoxam y un ballooning localizado en algunas dislocaciones cuando se tratan con 1,4-dioxano. En el fenómeno de ballooning inconvencional los balones aparecen rodeados de anchas bandas rayadas o cintas corrugadas.

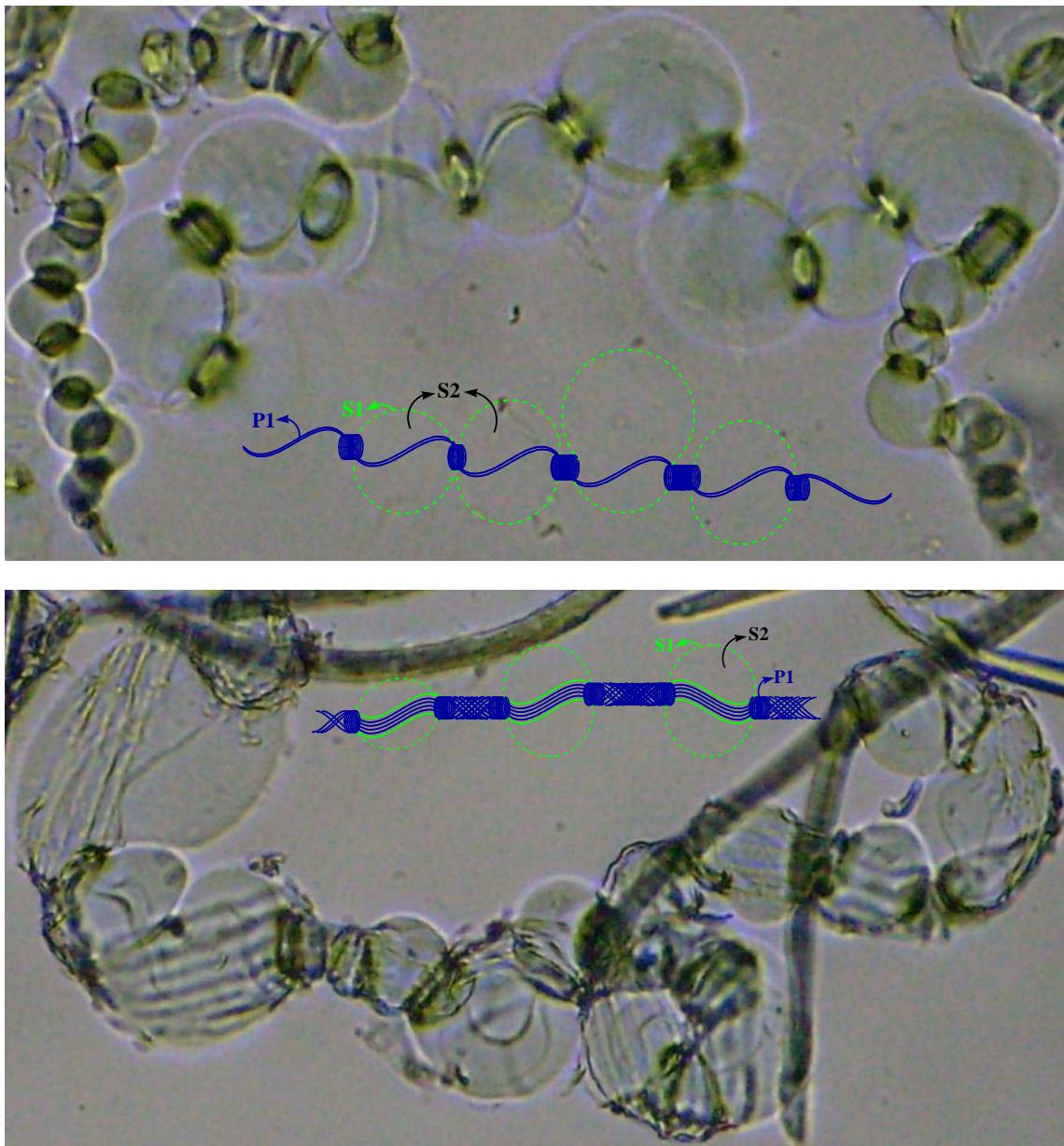
Otras células de albardín se hinchan de manera muy diferente a las fibras. Únicamente, pequeñas fibras punteadas y algunos vasos punteados largos, pueden mostrar rotura de su **P1** y cierto hinchado de su pared interior. Si bien esto ocurre con muy poca frecuencia y tiene poco parecido con el hinchado de las fibras.

##### **6.2.4.1.- Formación de balones: Ballooning no convencional.**

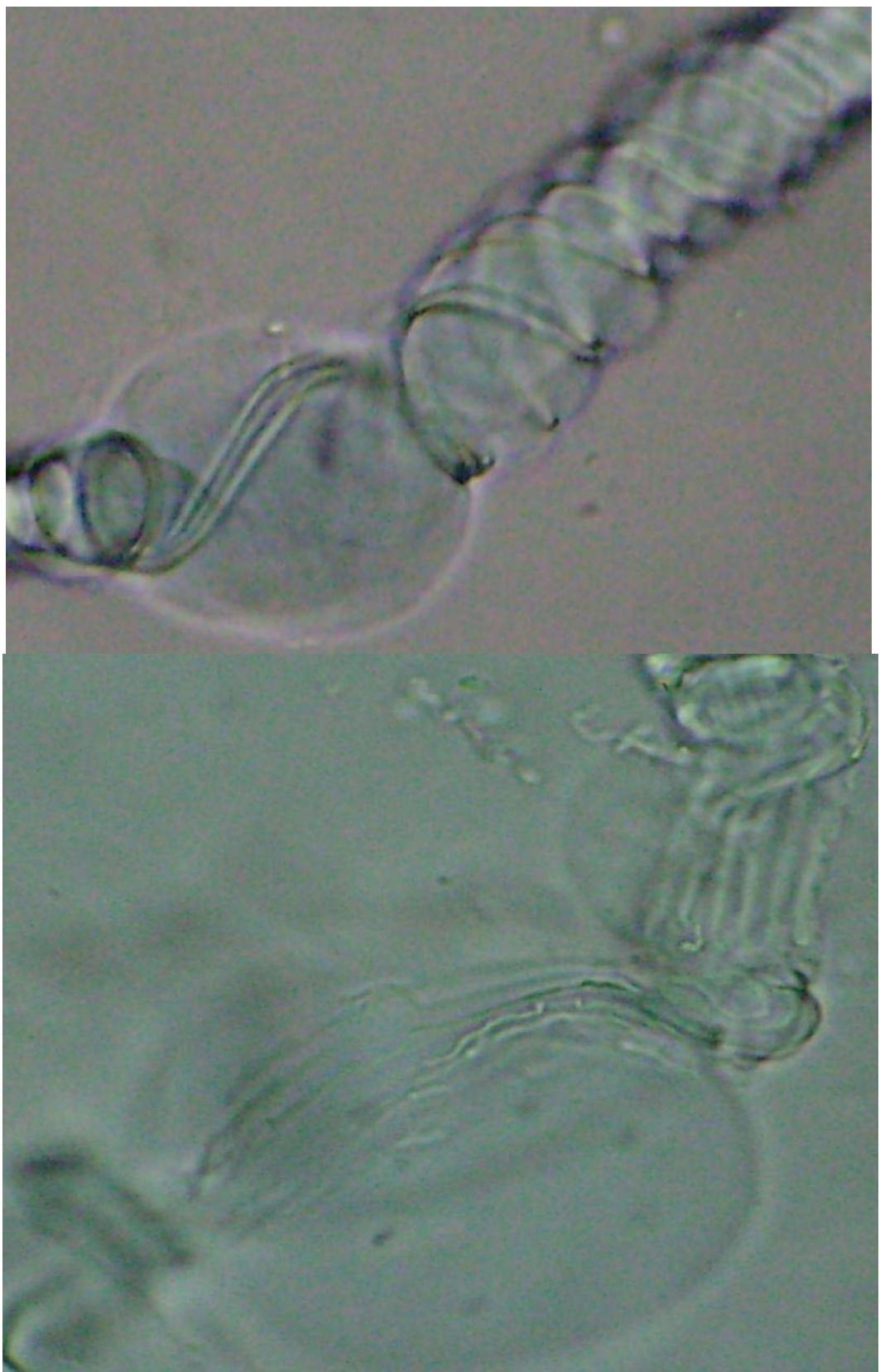
El fenómeno de ballooning inconvencional aparece de manera dominante, cuando las fibras de albardín modificadas se hinchan con disolventes en los que la pared **P1** resulta totalmente insoluble o al menos, mucho más insoluble que la pared secundaria. La **P1** se rompe bajo la presión de la celulosa fácilmente disuelta de la capa **S2**. Pero los fragmentos de la **P1** poco hinchada (poco reblandecida) no muestran la tendencia a plegarse generando hilos gruesos, característica del ballooning convencional, sino que permanecen como cintas corrugadas.

Las figuras 2, 3 y 4 muestran esquemas comparativos de los fenómenos de ballooning convencional y no convencional. Además de la formación de fragmentos de la **P1** con forma de banda a rayas, otras características del ballooning inconvencional son las siguientes: 1º.- Generalmente, la **P1** suele fragmentarse solo longitudinalmente y por tanto forma largos fragmentos con la longitud original de la fibra. 2º.- Los balones son más pequeños que en el convencional. Se rompen rápidamente en cuanto alcanzan un tamaño moderado, liberando la celulosa disuelta de la capa **S2** y dejando atrás una ancha cinta corrugada totalmente insoluble y tan larga como la fibra original.

Las siguientes microfotografías 38 a 48, muestran de forma comparativa algunas de las características de los dos fenómenos de ballooning (convencional y no convencional) de fibras de albardín nativas y modificadas.



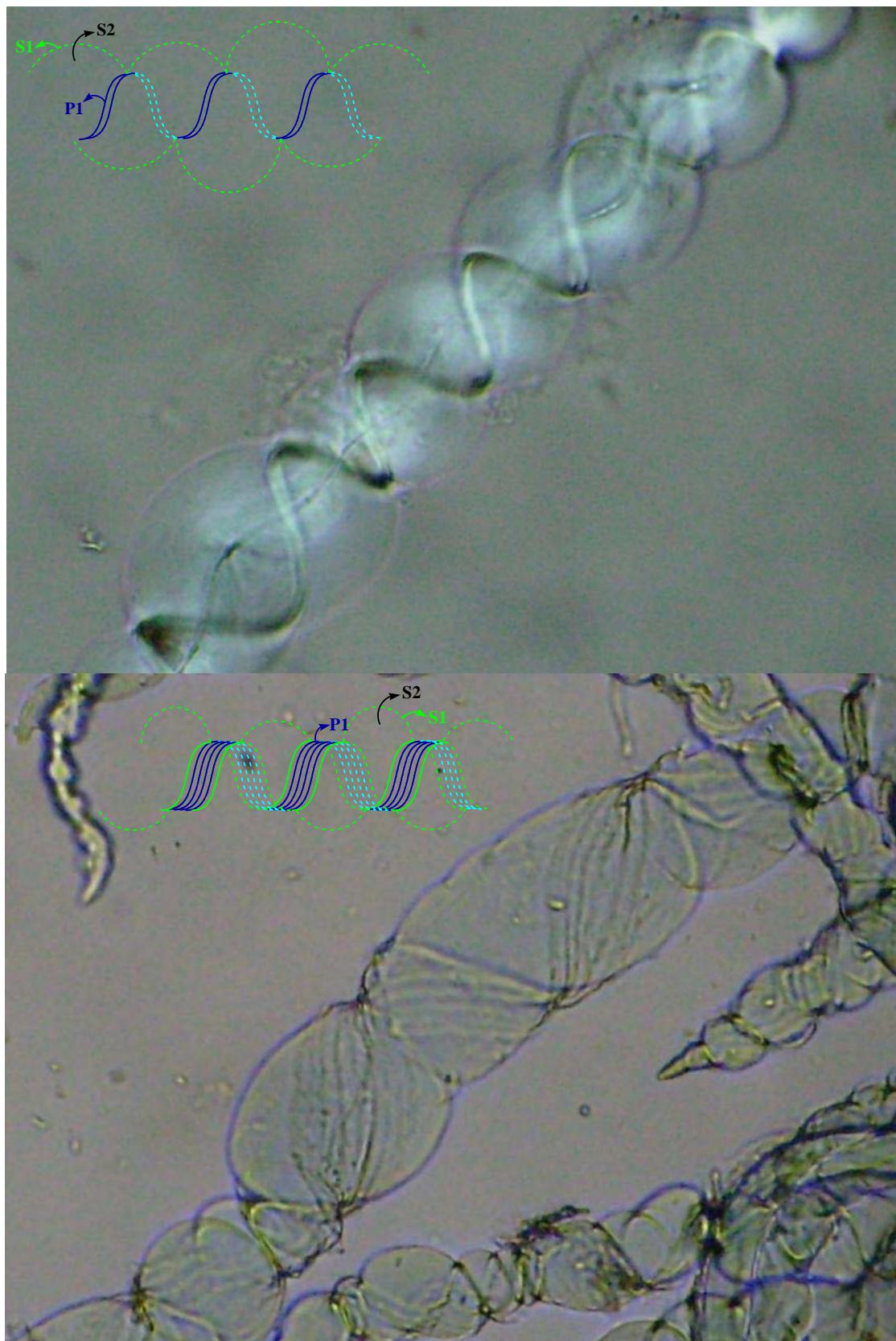
**Microfotografías 38 y 39** (100X) Ballooning de fibras de albardín en cuoxam 1M. Balones separados por collares y rodeados por hilos helicoidales (arriba) y rodeados por cintas corrugadas (abajo). (Arriba, fibra cianoetilada con bajo grado de sustitución, abajo, fibra acetilada superficialmente).



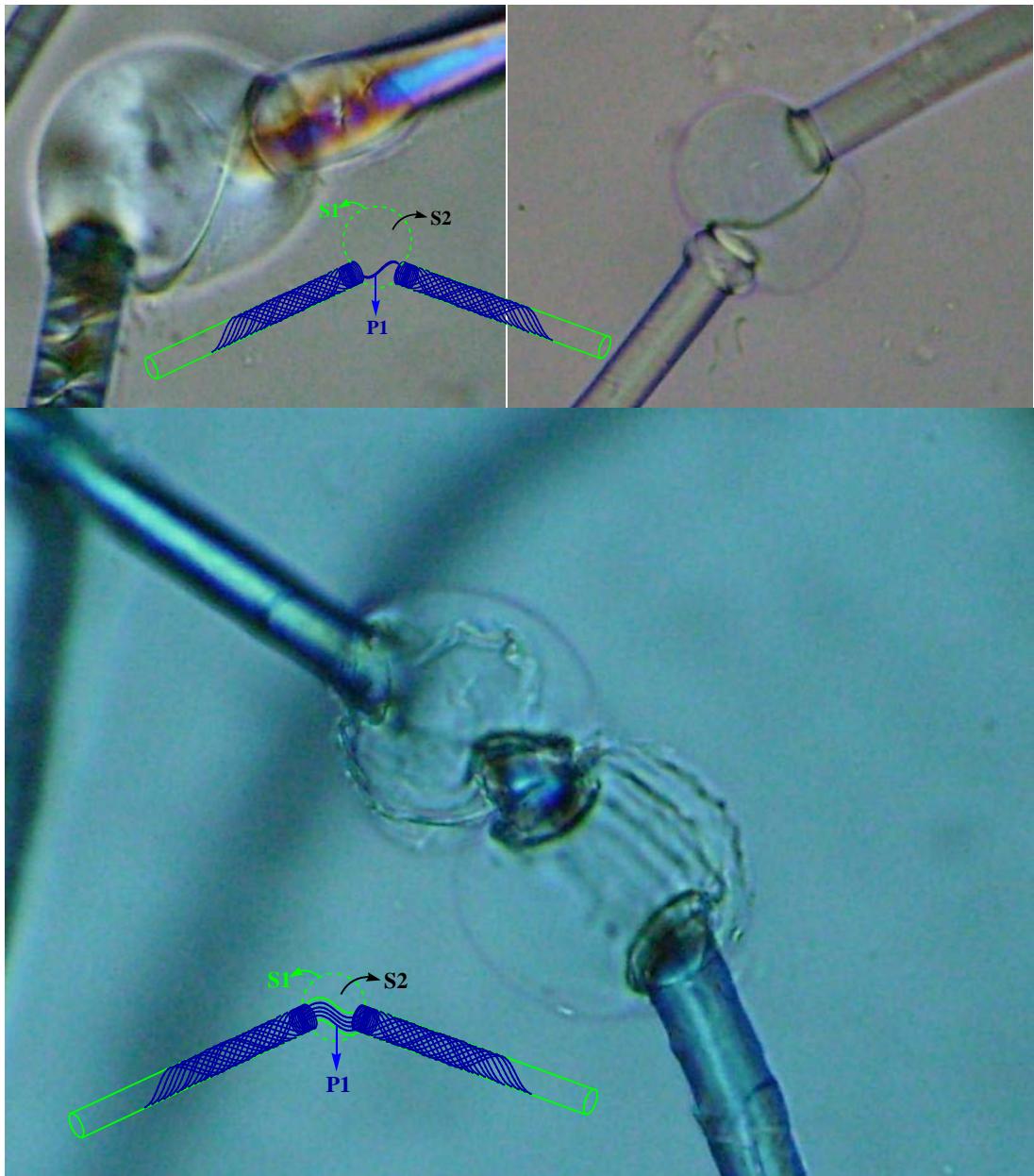
**Microfotografías 40 y 41** (200X) Ballooning de fibras de albardín cianoetiladas (bajo grado de sustitución) en cuoxam 1M. Detalle de fragmentos de **P1** que rodean a los balones; (arriba) plegado formando un grueso hilo helicoidal (compuesto de dos cilindros) y (abajo) en forma de cinta corrugada.



**Microfotografías 42 y 43** (200X) Ballooning de fibras de albardín en cuoxam 1M. Puede observarse la disposición helicoidal rodeando los balones tanto del grueso hilo (arriba, fibra nativa) como de la cinta corrugada (abajo, fibra acetilada superficialmente).



**Microfotografías 44 y 45** (200X) Ballooning de fibras de albardín en cuoxam 1M. Grandes balones cilíndricos constreñidos por un largo hilo helicoidal (arriba, fibra nativa) y una cinta corrugada helicoidal (abajo, fibra acetilada superficialmente).

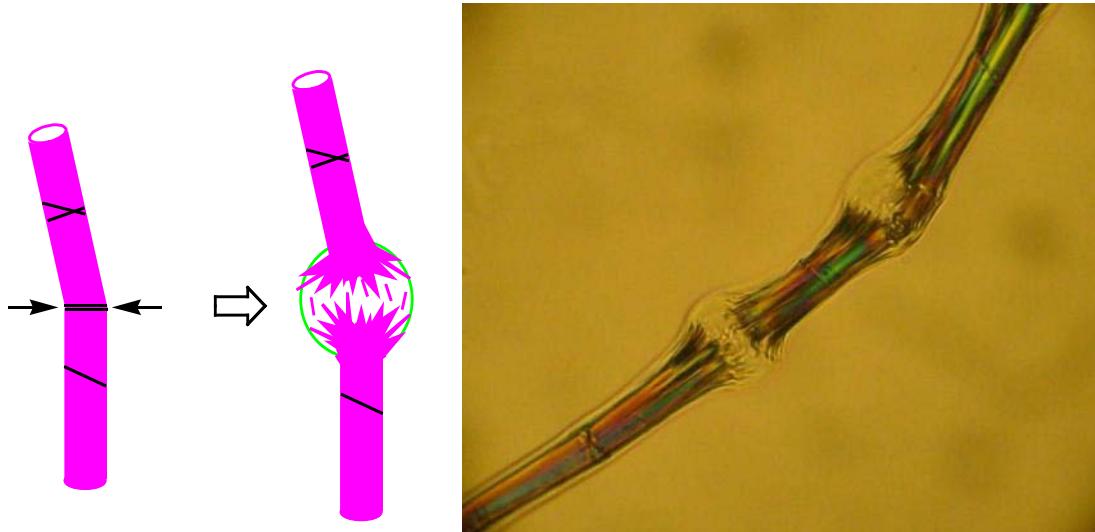


**Microfotografías 46, 47 y 48** (200X) Ballooning de fibras de albardín en cuoxam 1M. Formación de pequeños balones en fibras hinchadas casi inapreciablemente. Arriba izquierda, fibra nativa. Arriba derecha, fibra cianoetilada y abajo, fibra acetilada superficialmente.

#### 6.2.4.2.- Formación de balones localizados en dislocaciones.

Disolventes y reactivos pueden penetrar fácilmente en el interior de la fibra en las dislocaciones, debido a que en estas zonas, la estructura de la fibra está dañada y/o deformada. Por consiguiente, cuando las fibras de albardín se modifican superficialmente, además de la pared P1, el interior de la fibra también resulta modificado en las dislocaciones más severas. Al tratar las fibras modificadas superficialmente con un disolvente malo de celulosa pero mediocre de celulosa modificada, las zonas modificadas se hinchan formando pequeños balones localizados en las dislocaciones.

Estos pequeños balones presentan las siguientes características: 1.- Su diámetro es tan apenas un poco mayor que el de la fibra. 2.- En su interior aparecen muchas partículas sólidas de celulosa sin modificar suspendidas en la disolución de celulosa modificada. Estas partículas de celulosa aparecen como varillas o agujas fuertemente birrefringentes. 3.- En el interior del balón la celulosa se disuelve mediante fragmentación. La fibra no se desintegra y normalmente ni siquiera se fragmenta, únicamente presenta zonas disueltas mediante fragmentación en el interior de los balones localizados en las dislocaciones más severas.



**Figura 8.** El dibujo muestra una representación esquemática del proceso de formación de un balón localizado en una dislocación de una fibra de albardín que presenta varias dislocaciones. Disolventes y reactivos penetran al interior de la fibra en la dislocación más drástica (flechas negras) provocando un pequeño hinchamiento localizado. En el interior del pequeño balón localizado en la dislocación, la celulosa se disuelve mediante fragmentación, apareciendo numerosas partículas alargadas como varillas fuertemente birrefringentes. La **microfotografía 49** de la derecha (200X, luz polarizada) muestra una fibra con dos pequeños balones localizados en dos dislocaciones y al menos, otras tres sin hinchar. En el interior de los balones pueden apreciarse partículas de celulosa sin disolver, alargadas y fuertemente birrefringentes. (Fibra de albardín acetilada superficialmente y tratada con 1,4-dioxano).

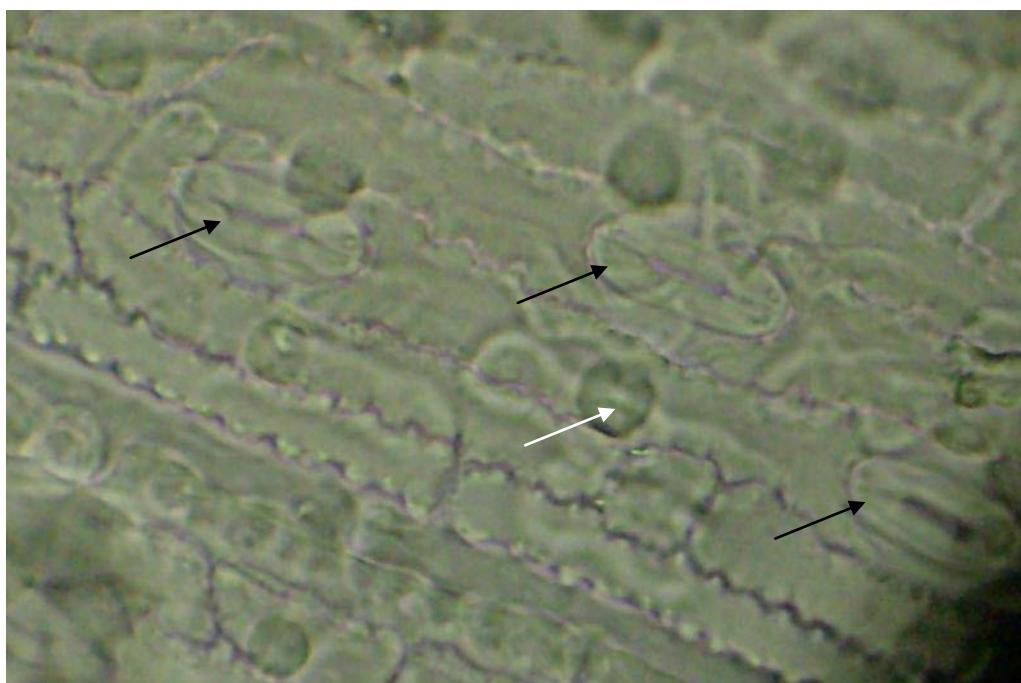
#### **6.2.4.3.- Ballooning de células asociadas a las fibras de albardín.**

De todas las células presentes en las muestras de fibras de albardín, únicamente las fibras se hinchan y disuelven mediante ballooning. En los siguientes sub-apartados se exponen las células asociadas a las fibras y el hinchado con cuoxam de aquellas que presentan algún fenómeno parecido al de ballooning.

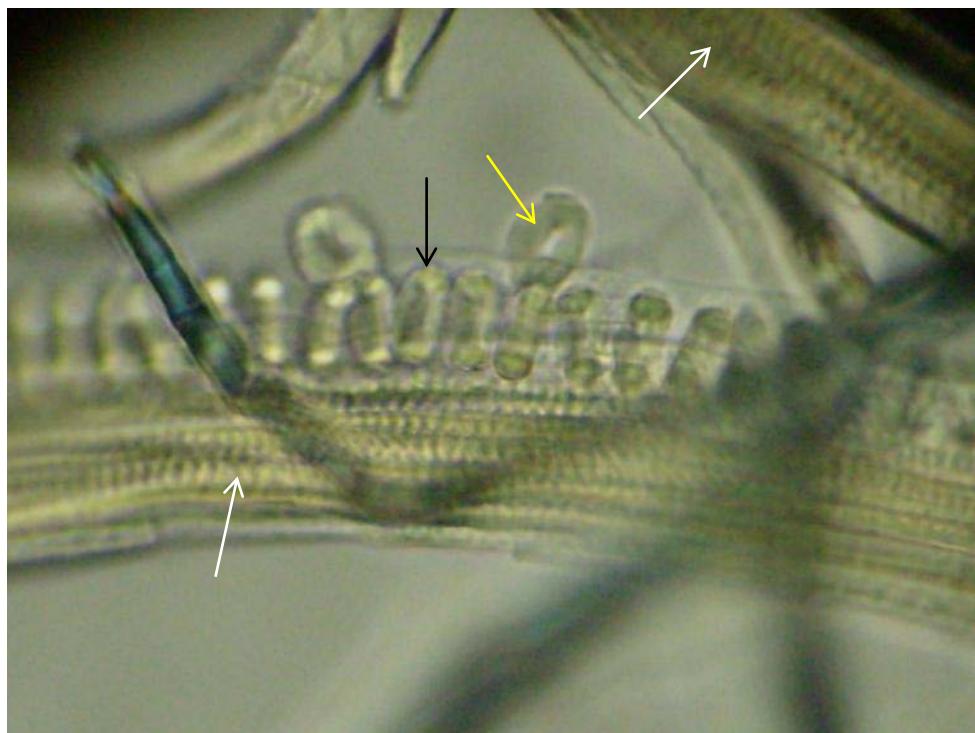
#### **6.2.4.3.1.- Introducción: Células asociadas a las fibras de albardín.**

Durante todas las etapas de su procesado, las fibras de albardín aparecen enteras o como grandes fragmentos, individualizadas o formando haces de distinto grosor. Sin embargo, siempre van acompañadas de una gran cantidad y variedad de fragmentos de tejidos, células enteras y restos de células de los diferentes tejidos que forman la planta de albardín. Evidentemente, esto es debido a que se obtienen a partir de la planta de albardín entera (sin raíces, flores, ni frutos). Los diferentes tratamientos mecánicos y químicos de las fibras reducen la proporción de estas impurezas, pero muchas persisten durante todo su procesado. [29]

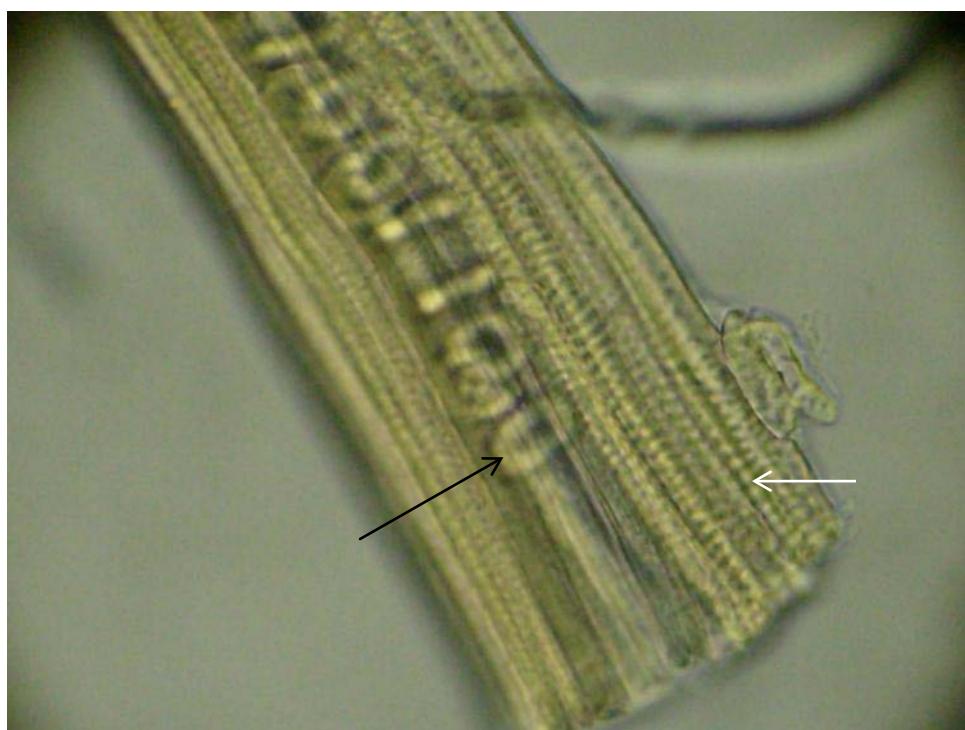
Las fracciones de tejidos y células, que con mayor frecuencia acompañan a nuestras fibras de albardín, son fragmentos y células de epidermis y grandes fragmentos de haces vasculares. Estos últimos, al romperse generan una gran cantidad de diferentes vasos (punteados, anulares, espirales y reticulados, son los más frecuentes) y los característicos fragmentos de algunos de estos vasos, es decir los engrosamientos anulares y espirales. [29]



**Microfotografía 50.** (200X) Detalle de epidermis de albardín donde puede apreciarse las células con forma de peine con o sin protuberancias (flecha blanca) y varios estomas (flechas negras). Todos estos elementos presentan la característica ordenación paralela de las gramíneas.



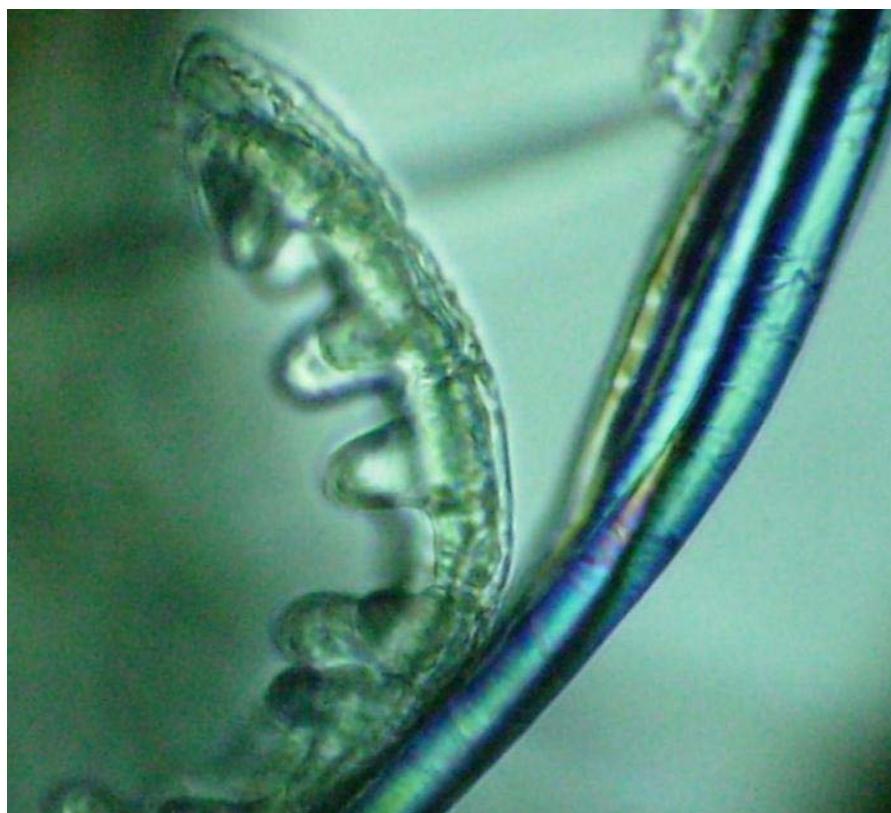
**Microfotografías 51 y 52** (200X) muestran haces vasculares que con mucha frecuencia acompañan a las fibras de albardín, a pesar de haber sido deslignificadas y molidas. Estos haces, presentan en su centro grandes engrosamientos anulares (flechas negras) rodeados por gruesas capas de vasos reticulados, punteados, etc. (flechas blancas). El haz de la foto superior aparece seccionado longitudinalmente por su vaso central, liberando los anillos (engrosamientos anulares) (flecha amarilla).





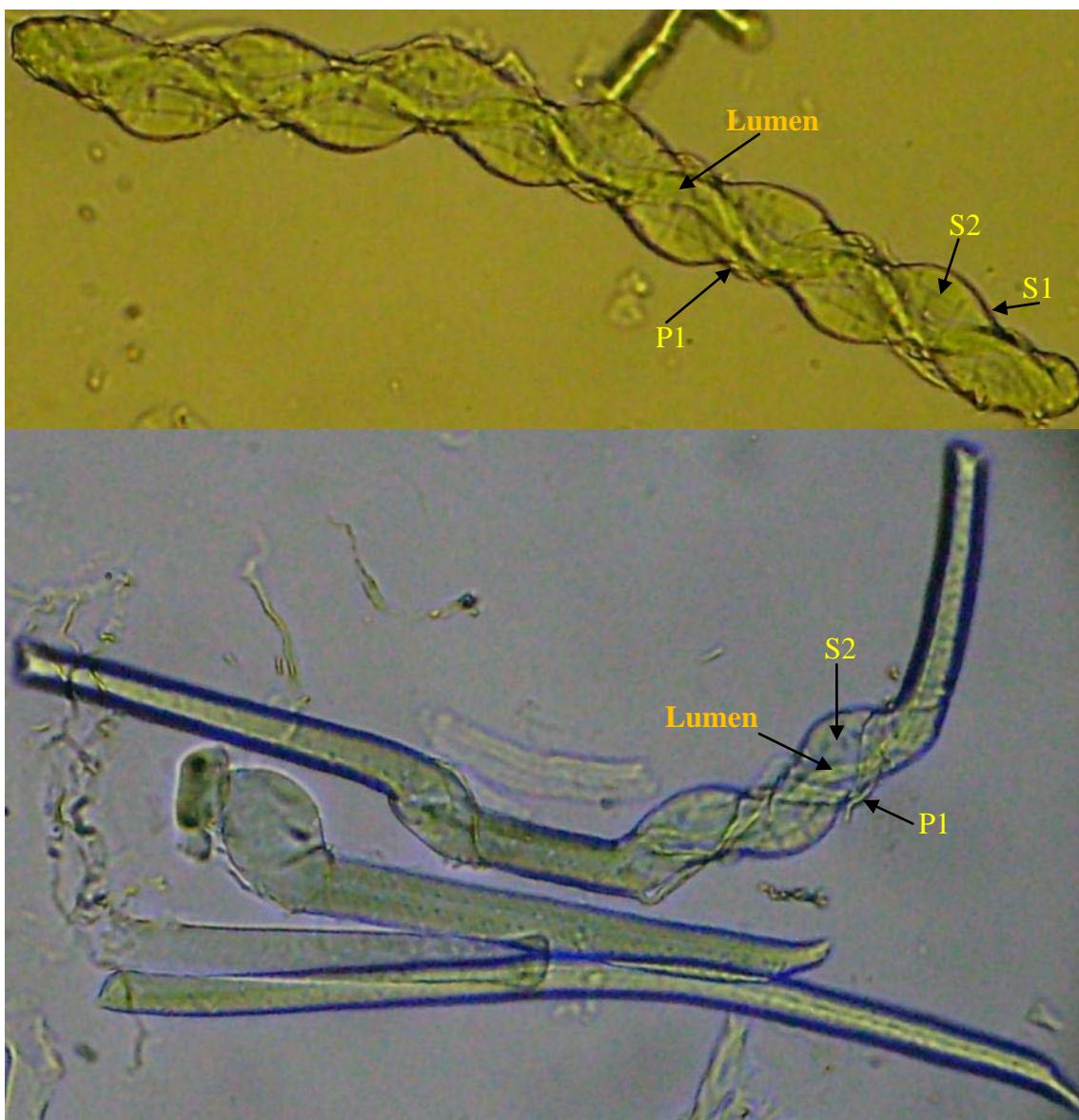
**Microfotografía 53.** (200X) (arriba) Detalle de vasos punteados, elementos que aparecen abundantemente en todas nuestras muestras y que provienen de las capas más exteriores de los haces vasculares de la fotos anteriores 14 y 15 (flechas negras).

**Microfotografía 54.** (200X) (abajo) Detalle de un pequeño haz de fibras subepidermiales con células de la epidermis todavía adheridas.

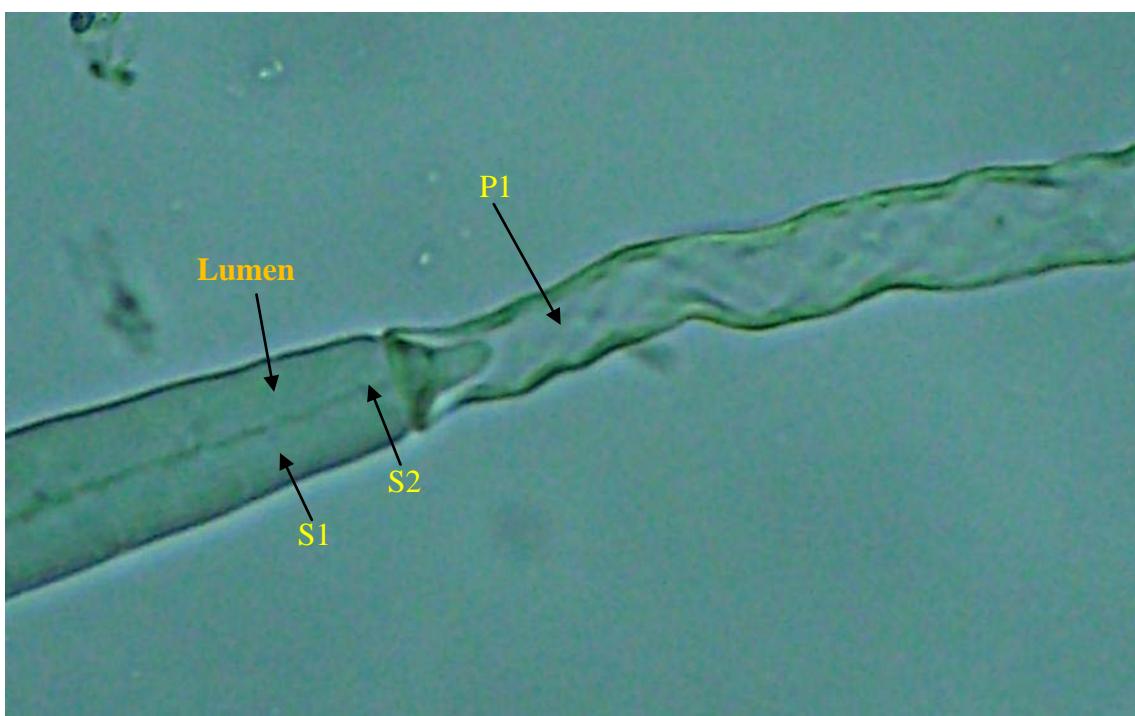
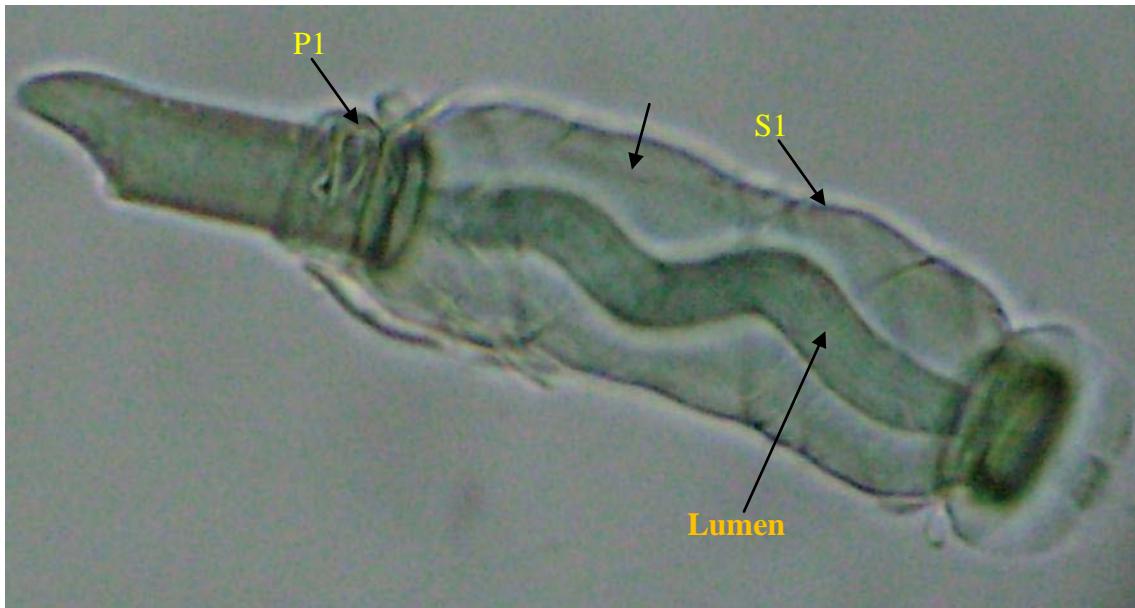


#### 6.2.4.3.2.- Disolución e hinchado de células asociadas a las fibras de albardín.

Las diferentes células que acompañan a las fibras de albardín, tan apenas se hinchan y no se disuelven en los disolventes y reactivos empleados para hinchar, disolver y modificar las fibras de albardín. La forma de estas células es completamente diferente de la de las fibras. Únicamente, los vasos punteados más largos y algunas pequeñas fibras punteadas presentan una forma similar a las fibras de albardín ordinarias. Generalmente, los vasos son huecos, sin gruesas capas de celulosa en su interior. Sin embargo, las fibras punteadas pueden formar pequeños balones durante su hinchamiento. Estas fibras punteadas se distinguen fácilmente de las fibras por su pequeña longitud, sus punteados y algunas por sus extremos (como los de los vasos).



**Microfotografías 55 y 56** (200X) Ballooning de fibras punteadas y vasos punteados de albardín en cuoxam 1M. Foto superior, la P1 rota aparece dispuesta helicoidalmente alrededor de la pared secundaria hinchada (coinciéndiendo con el trayecto del canal del lumen). Foto inferior, fibras punteadas con extremos puntiagudos de vasos [Células presentes en muestras de fibras de albardín Mercerizadas y blanqueadas con tratamiento ácido ( $H_2O_2$  30% y ác. acético glaciar)].



**Microfotografías 57 y 58 (200X)** Detalles de fibras punteadas de albardín en cuoxam 1M. Foto superior, balón cilíndrico localizado en un extremo terminal de la fibra. Foto inferior, pared **P1** extruida entera, todavía unida a la fibra por uno de sus extremos. [Células presentes en muestras de fibras de albardín Mercerizadas y blanqueadas con tratamiento ácido ( $H_2O_2$  30% y ác. acético glacial)].

### **6.2.5.- Clasificación de los mecanismos de hinchado y disolución de las fibras de albardín nativas y modificadas en función de la naturaleza del disolvente.**

Los disolventes y reactivos empleados en este estudio que permiten observar detalladamente algunos de los fenómenos asociados al hinchado y disolución de las fibras de albardín son principalmente, ácido fosfórico 85%, cuoxam, 1,4-dioxano y anhídrido acético en presencia de trazas de HClO<sub>4</sub>. La celulosa de las fibras se disuelve en cuoxam mediante la formación de complejos de coordinación con el Cu<sup>+2</sup> [47, 48]. La celulosa activada con ác. acético resulta acetilada y disuelta en anhídrido acético con trazas de HClO<sub>4</sub>.

**1.-Disolvente bueno;** la fibra se disuelve mediante fragmentación.

**Ácido fosfórico 85% (25°C),** disuelve mediante fragmentación las fibras de albardín deslignificadas.

**2.-Disolvente mediocre-bueno;** la fibra se hincha considerablemente pero de manera irregular, apareciendo hinchamientos esféricos (balones) en determinadas zonas a lo largo de la fibra. Estos balones acaban rompiéndose y la fibra disolviéndose.

**Cuoxam 1M (25°C),** disuelve mediante ballooning convencional las fibras de albardín deslignificadas y algunas cianoetiladas. Las fibras acetiladas superficialmente y algunas cianoetiladas, resultan disueltas (excepto la P1) mediante ballooning no convencional.

**Ácido fosfórico 85% (25°C),** disuelve mediante ballooning convencional y no convencional todas las fibras de albardín cianoetiladas.

**1,4-Dioxano (90°C),** disuelve mediante ballooning convencional las fibras de albardín completamente acetiladas.

**Anhídrido acético y trazas de HClO<sub>4</sub> (25°C),** acetila y disuelve mediante ballooning convencional las fibras de albardín activadas con ác. acético del 90% (durante más de 5 minutos) o activadas con ác. acético glacial (durante varias horas).

**3.-Disolvente mediocre-malo;** ocurre como en el caso anterior, pero los balones no se rompen y la fibra no se disuelve. Pueden comportarse como mediocres-malos los disolventes y reactivos del apartado anterior cuando actúan mas diluidos o a menor temperatura o durante menos tiempo.

**4.-Disolvente malo;** la fibra se hincha homogéneamente y no llega a disolverse.

**Anhídrido acético / Tolueno (1:1, v/v) y trazas de HClO<sub>4</sub> (25°C),** acetila e hincha homogeneamente las fibras de albardín activadas con ác. acético del 90% (durante más de 5 minutos) o activadas con ác. acético glacial (durante varias horas).

#### **6.2.6.- Fragmentación de las fibras de albardín.**

Los fenómenos de hinchado y/o disolución mediante fragmentación comúnmente observados en las fibras de albardín son los siguientes: 1.- Fragmentación en balones localizados en dislocaciones. 2.- Hinchado y/o disolución mediante fragmentación de la capa S2, durante la acetilación de las fibras con anhídrido acético. El primero se expone en el sub-apartado **6.2.4.2** (formación de balones localizados en dislocaciones). El segundo, el más característico, es el que se expone con mayor detalle en este sub-apartado.

Cuando las fibras de albardín activadas superficialmente se tratan con anhídrido acético, únicamente su pared **P1** y algunas dislocaciones resultan acetiladas. En este caso, el hinchado y/o disolución mediante fragmentación se observa solo en las dislocaciones acetiladas. Sin embargo, durante la acetilación de las fibras activadas extensivamente, toda la fibra resulta acetilada, observándose entonces, el hinchado y/o disolución mediante fragmentación de toda la capa **S2**.

La acetilación localizada superficialmente se realiza tratando las fibras con ác. acético glacial durante unos pocos minutos (10-15 minutos). Prolongando este tratamiento durante varias horas, o empleando un activante más efectivo (ác. acético del 90%, durante unos pocos minutos), se consigue una activación más extensiva.

La **Figura 9** muestra esquemáticamente las etapas de fragmentación durante la acetilación de fibras de albardín activadas con ác. acético del 90%.

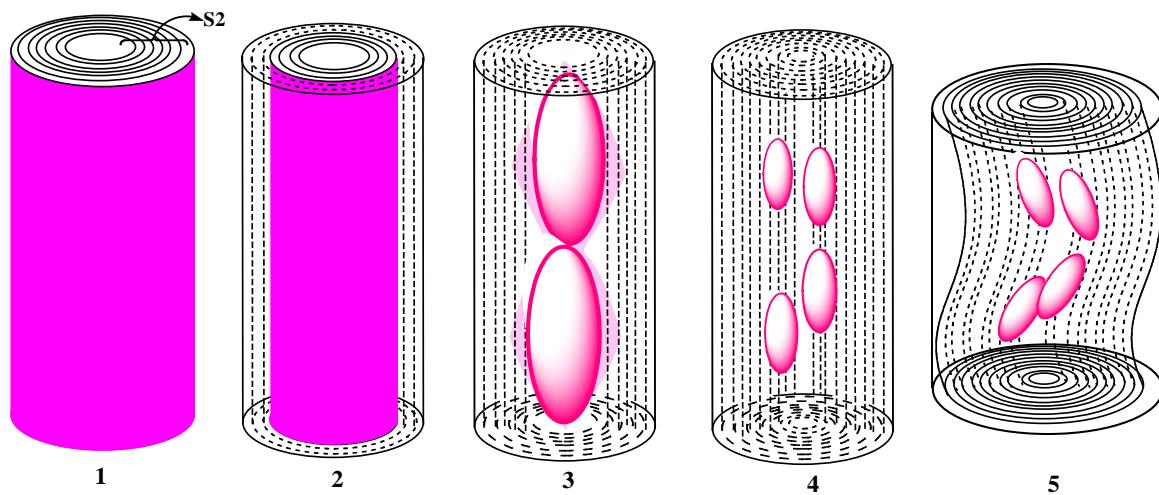
1.- La fibra aparece fuertemente birrefringente cuando se observa con el microscopio polarizador.

2.- La mezcla de acetilación penetra por la superficie de la fibra hinchando y acetilando homogéneamente las capas exteriores. Las capas hinchadas y acetiladas pierden su birrefringencia original y se vuelven completamente transparentes. A medida que la fibra se vuelve transparente, se hacen visibles las capas más exteriores de la pared **S2** (como líneas tenues).

3.- Debido a la existencia de zonas débiles que facilitan la penetración y difusión de la mezcla de acetilación, el interior de la fibra comienza a fragmentarse, apareciendo grandes fragmentos sólidos, alargados axialmente y fuertemente birrefringentes.

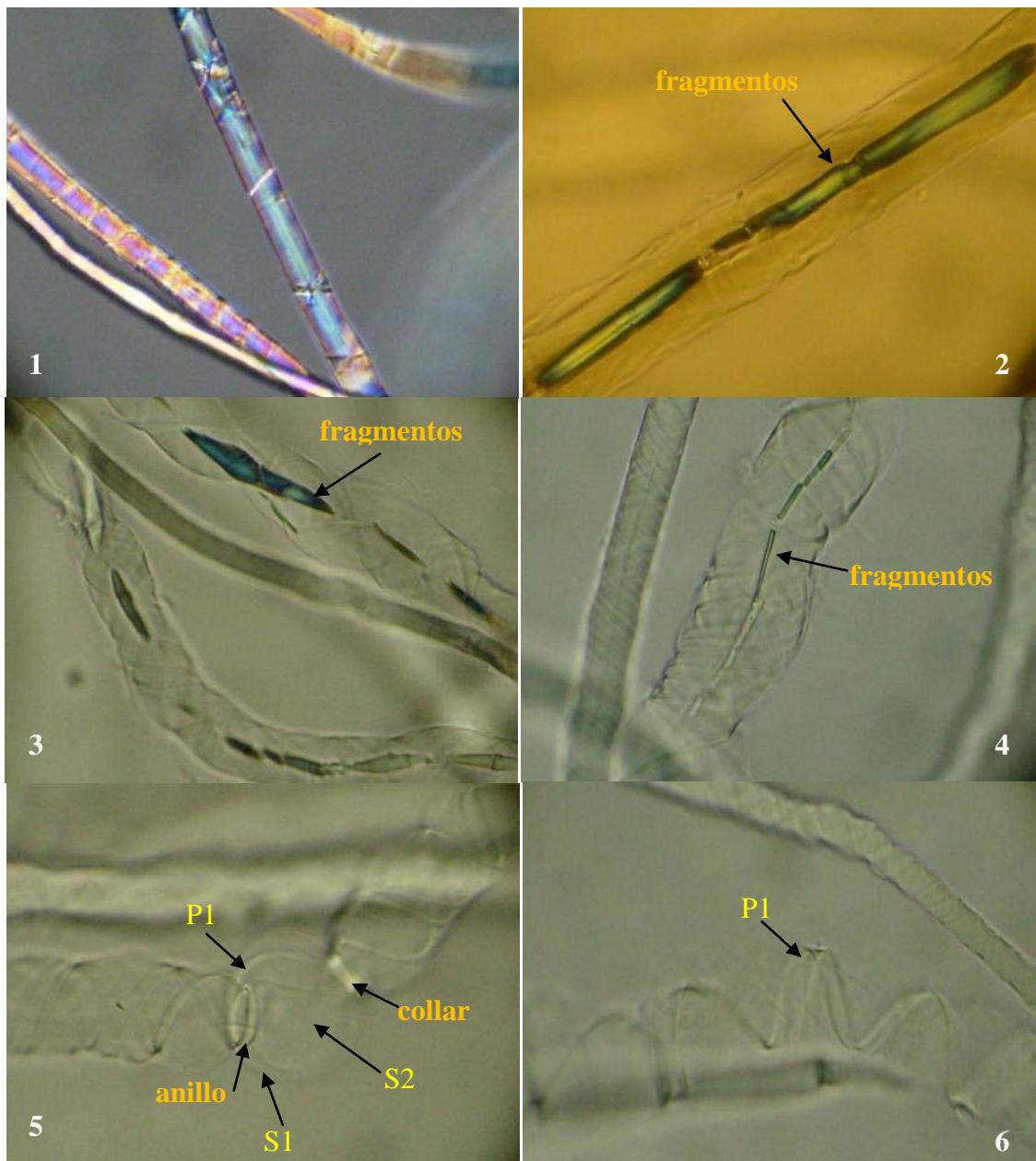
4.- El tamaño de los fragmentos disminuye y algunos se fragmentan originando fragmentos alargados más pequeños.

5.- Debido a la contracción axial de la fibra, los fragmentos adoptan una característica disposición en zigzag a lo largo de la fibra.



**Figura 9.** Representación esquemática de las etapas del proceso de fragmentación durante la acetilación de una fibra de albardín activada con ác. acético del 90%.

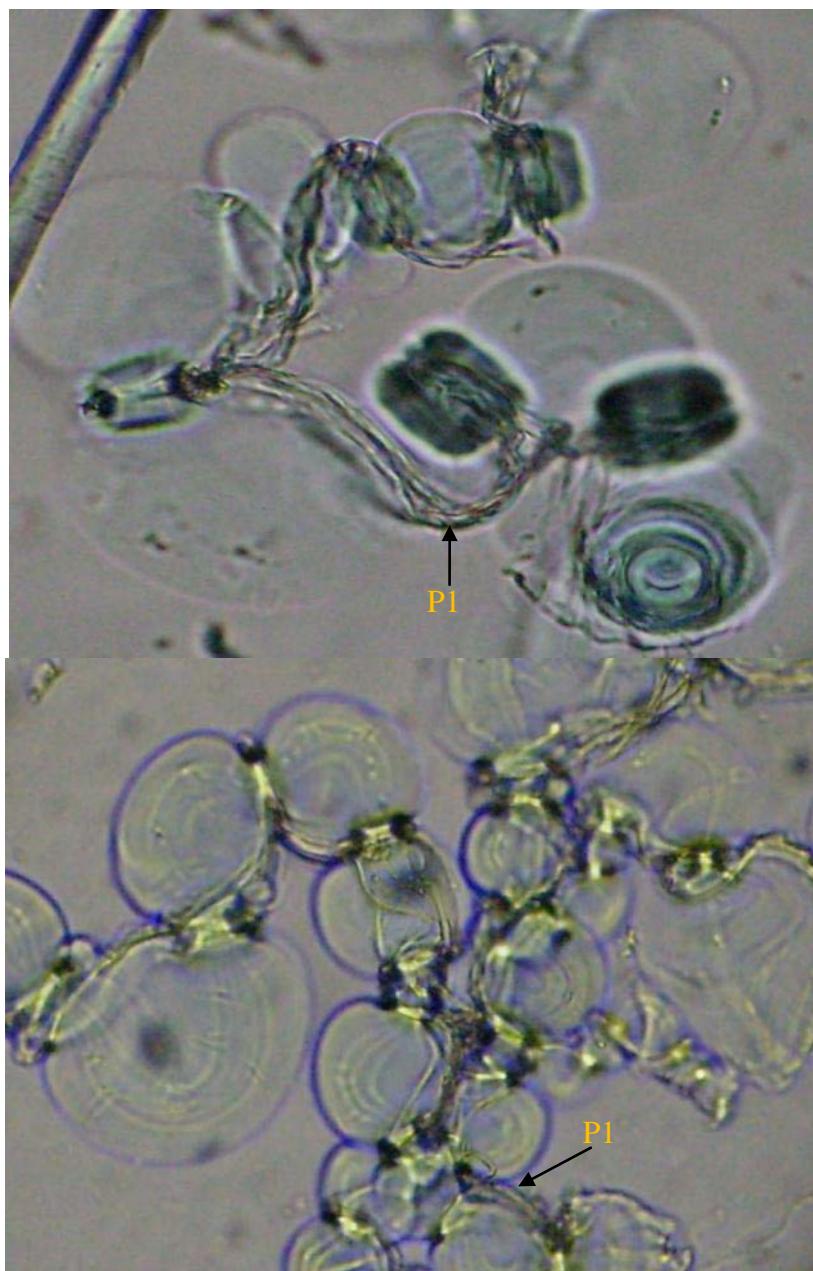
En la siguiente **figura 10**, aparecen seis **microfotografías 59-64**, mostrando diferentes etapas del proceso completo de acetilación de fibras de albardín activadas con ác. acético del 90%. Acetilación directa en la platina del microscopio polarizador con anhídrido acético y trazas de  $\text{HClO}_4$  a 20°C. En estas fotos aparecen ballooning convencional, fragmentación y disolución de las fibras acetiladas.



**Figura 10. Microfotografías 59-64 (200X, luz polarizada)** de la acetilación de fibras de albardín activadas con ác. acético del 90%. Acetilación directa en la platina del microscopio polarizador con anhídrido acético y trazas de  $\text{HClO}_4$  a 20°C. 1.- Las fibras activadas aparecen fuertemente birrefringentes antes de su acetilación. 2.- Despues de 5 minutos de acetilación pueden observarse grandes fragmentos sólidos, alargados axialmente y fuertemente birrefringentes, mientras que el resto de la fibra hinchada aparece completamente transparente. 3 y 4.- El tamaño de los fragmentos disminuye, algunos se fragmentan originando otros más pequeños y alargados. Debido a la contracción de la fibra, los fragmentos quedan dispuestos en zigzag a lo largo de la fibra. 5.- Los fragmentos se disuelven por completo y los balones revientan liberando la celulosa acetilada disuelta de la capa S2. 6.- Finalmente, quedan por disolver los fragmentos de la P1 en forma de gruesos hilos espirales.

#### 6.2.7.- Contracción y rotación de fibras albardín.

Cuando algunas fibras de albardín entran en contacto con algunos agentes acetilantes o disolventes, rotan y se contraen realizando espectaculares movimientos muy vivos (tipo twisting). Es frecuente observar que largas fibras completamente balonadas (llenas de balones), se retuerzan vivamente quedando completamente retorcidas sobre sí mismas, de manera que todos los balones quedan juntos y la fibra semeja una agrupación de pequeñas esferas o glóbulos transparentes atados por gruesos hilos o cintas corrugadas (fragmentos de la pared P1) (microfotografías 65 y 66).



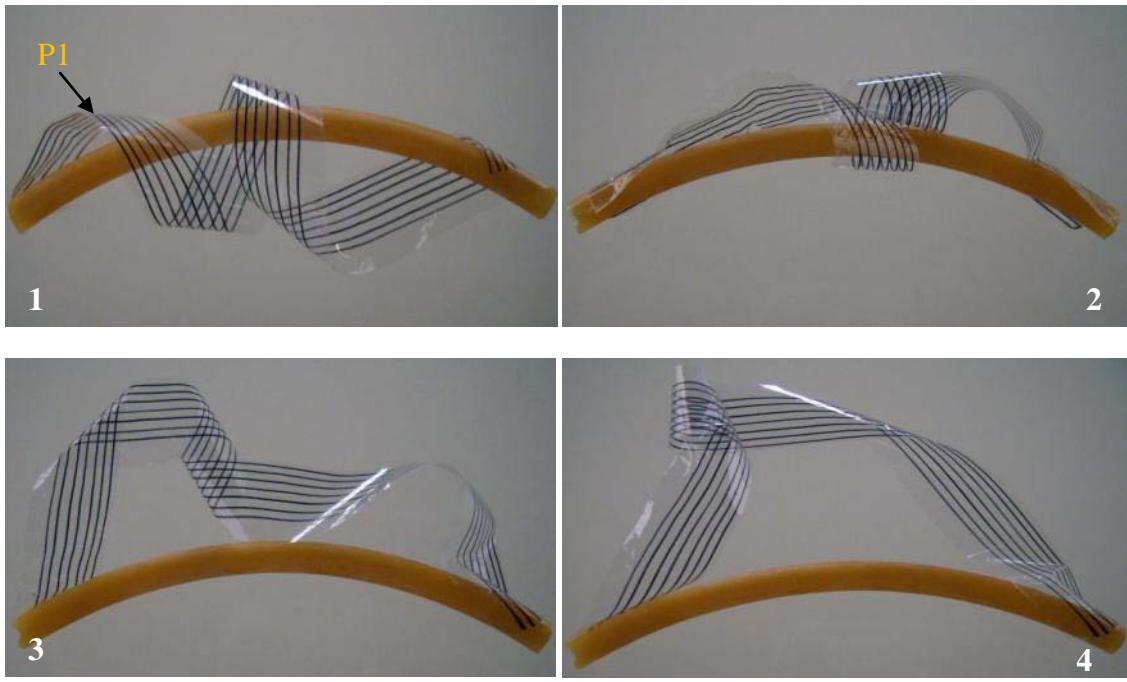
**Microfotografías 65 y 66.** Largos fragmentos de fibras de albardín retorcidas y completamente balonadas en cuoxam, que semejan una agrupación de balones atados por una cinta. Arriba, fibra albardín Mercerizada y blanqueada con tratamiento ácido ( $H_2O_2$  30% y ác. acético glacial) y después acetilada superficialmente sin activación previa. Abajo, fibra cianoetilada (bajo grado de sustitución).

Frecuentemente, la pared **P1** de las fibras de albardín hinchadas, se rompe longitudinalmente generando un único fragmento (similar a una cinta corrugada) que queda unido a la fibra únicamente por sus extremos terminales. Esta banda queda dispuesta siempre, helicoidalmente alrededor de la pared secundaria hinchada (**microfotografía 67**). Únicamente, en las fibras más pequeñas se pueden observar esta cinta dispuesta linealmente como si se tratase de la columna vertebral de la fibra (**microfotografía 28**).

La disposición helicoidal de la cinta alrededor de la pared secundaria hinchada, indica que la rotura longitudinal de la **P1** es helicoidal y no lineal. Obviamente, no es posible intercambiar las disposiciones helicoidal y lineal de la **P1** rota, sin que la pared secundaria quede retorcida helicoidalmente (como trata de ilustrar la serie de fotografías de la figura 11).



**Microfotografía 67.** Fibra con la pared **P1** rota formando un único fragmento con forma de banda a rayas. La banda está unida a la fibra únicamente por sus extremos y su disposición es helicoidal alrededor de la pared secundaria hinchada. Fibra albardín Mercerizada y blanqueada con tratamiento ácido ( $H_2O_2$  30% y ác. acético glacial) y después acetilada superficialmente sin activación previa.



En las fotos de la **figura 11** aparece un modelo de fibra, formado por un tubo de goma, como pared secundaria hinchada y una cinta unida a sus extremos, como fragmento de pared **P1** rota longitudinalmente. Inicialmente (foto 1) la cinta aparece dispuesta helicoidalmente alrededor del tubo. Evidentemente, no es posible disponer esta cinta linealmente entre los extremos del tubo (mediante movimientos de rotación, contracción o contorsión, fotos 2 a 4) sin liberar alguno de los extremos de la cinta.

## **7.- Parte experimental.**

### **7.1.- Aislamiento de las fibras de albardín.**

La parte experimental correspondiente a los tratamientos químicos realizados a las fibras de albardín durante su aislamiento, se describe detalladamente en el apartado 3.

### **7.2.- Acetilación de fibras de albardín.**

La acetilación es la reacción de modificación de las fibras de albardín que con mayor detalle se ha estudiado en este trabajo. Esta reacción se ha realizado en fase sólida y en disolución, con distintos catalizadores (ácido perclórico y yodo), directamente en la platina del microscopio polarizador y a microescala en el laboratorio (con 0.5 g de fibras).

Aparentemente, estos métodos diferentes conducen a la obtención de fibras acetiladas muy similares, siempre que las fibras hayan sido activadas de igual manera, pues es la etapa de activación el paso determinante del proceso de acetilación.

Efectivamente, hemos podido comprobar que en todos estos métodos de acetilación, las fibras de albardín resultan acetiladas selectivamente en su pared **P1**, cuando se activan con ác. acético glacial únicamente durante unos minutos (10-15 minutos). Prolongando esta activación durante varias horas o activando (10-15 minutos) con ác. acético 90%, conduce a la acetilación completa de la fibra.

La acetilación de las fibras de albardín, directamente sobre la platina del microscopio, se realiza con anhídrido acético y  $\text{HClO}_4$  (catalizador) a  $25^\circ\text{C}$  con y sin la presencia de tolueno como no-disolvente y durante tiempos de reacción de unos pocos minutos.

Sin embargo, la acetilación de las fibras de albardín con yodo como catalizador se realiza únicamente a microescala en el laboratorio con anhídrido acético a  $110^\circ\text{C}$ , siempre en presencia de tolueno como no-disolvente y durante 3 horas.

Independientemente de su proceso de designificación, todas las fibras de albardín se han acetilado mediante estos métodos. Todas se acetilan de manera muy similar excepto la Mercerizadas (apartado 3.2a) que resultan menos reactivas y las blanqueadas (apartado 3.2b) que resultan muy reactivas, siendo las únicas que se acetilan sin necesidad de ninguna activación.

Una vez acetiladas, las de mayor grado de acetilación se hinchan y disuelven en 1,4-dioxano a  $90^\circ\text{C}$  mediante ballooning convencional. Mientras que en este disolvente, las acetiladas selectivamente en su **P1** muestran ballooning localizado en algunas

dislocaciones. Por otro lado, estas últimas fibras se hinchan y disuelven en cuoxam a 20°C mediante ballooning no-convencional.

### **7.2.1.- Introducción.**

La acetilación es la modificación química más comúnmente empleada para mejorar las fibras vegetales en su utilización como refuerzo en biocomposites de matriz orgánica. La acetilación de los grupos hidroxilo de la celulosa reduce la naturaleza hidrofílica de la fibra vegetal, disminuyendo su tendencia a absorber agua e incrementando su compatibilidad con la matriz orgánica [10, 11, 49-56].

La acetilación de nuestras fibras de albardín se realizó en disolución y en fase sólida, preservando en este último caso la morfología de su pared celular. La extensión de la acetilación se determina en función de los activantes y de los tiempos de activación y acetilación. Por este procedimiento, podemos conseguir acetilar superficialmente las fibras, de manera que la acetilación quede restringida selectivamente a la pared celular más exterior, la pared primaria **P1**.

El transcurso de las reacciones de acetilación de las fibras de albardín puede seguirse directamente, ya que las acetilaciones se pueden realizar en la platina del microscopio polarizador. La extensión de la acetilación de las fibras condiciona su característico comportamiento frente a determinados disolventes y agentes hinchantes. Estos comportamientos o fenómenos característicos que muestran las fibras durante su hinchado y disolución, también pueden seguirse directamente en el microscopio polarizador.

Desde hace más de 100 años, se han observado con el microscopio óptico, ciertos fenómenos característicos que se producen durante el hinchado y disolución de las fibras celulosicas nativas [41-43]. Especialmente, el fenómeno de ballooning [41-46]. Recientemente, este fenómeno ha sido detalladamente estudiado en varias fibras vegetales nativas y modificadas (nitradas, cianoetiladas, carboximetiladas) con diferentes disolventes [35-40].

Sin embargo, no hemos podido encontrar en la bibliografía descripción alguna de este fenómeno durante o después de la acetilación de fibras celulosicas nativas.

### **7.2.2- Acetilación de fibras de albardín en la platina del microscopio.**

La acetilación de las fibras de albardín, directamente sobre la platina del microscopio, se realiza con anhídrido acético y HClO<sub>4</sub> (catalizador) a 25°C, con y sin la presencia de tolueno y durante un tiempo máximo de 20 minutos.

En la acetilación sobre la platina del microscopio, distinguimos 4 casos en función del grado de activación de las fibras y de la presencia o ausencia de tolueno de la mezcla acetilante.

Como activante se emplea ácido acético con o sin agua. Por otra parte, el tolueno impide que durante la acetilación, la fibra acetilada se disuelva en la mezcla de reacción.

### **Efecto de la activación con ácido acético:**

En los dos casos siguientes 1 y 2, la acetilación de las fibras de albardín se realiza con anhídrido acético y  $\text{HClO}_4$  (catalizador) a 20°C.

#### *1º.- Caso: Acetilación completa y disolución de las fibras en la mezcla de reacción.*

Las fibras se acetilan rápidamente en estas condiciones de reacción, siempre y cuando estén suficientemente activadas. Conforme aumenta su grado de acetilación, su solubilidad en la mezcla de reacción también se incrementa. Por consiguiente, con el transcurso de la reacción, se observa que las fibras se hinchan prominentemente en la mezcla acetilante, unas de forma homogénea y otras muchas heterogéneamente, mostrando estas últimas el fenómeno de “ballooming”. Finalmente, algunas fibras acetiladas acaban disolviéndose por completo en la mezcla de reacción.

Estos hechos se observan cuando las fibras se activan durante varias horas con ácido acético glacial. También son suficientes unos pocos minutos (5-15 minutos) de activación con ácido acético del 90% para conseguir el mismo efecto.

#### *2º.- Caso: Acetilación superficial sin disolución de las fibras en la mezcla de reacción.*

Cuando la activación de las fibras con ácido acético glacial se realiza únicamente durante unos pocos minutos (15 minutos), las fibras se activan principalmente en su superficie y localmente en las dislocaciones. En este caso la acetilación queda restringida a estas zonas que únicamente muestran un hinchamiento muy discreto localizado en estas zonas y permanecen completamente insolubles en la mezcla de reacción.

### **Efecto del no-disolvente tolueno:**

En los dos casos siguientes 3º y 4º, la acetilación de las fibras de albardín se realiza en presencia de tolueno, con anhídrido acético y  $\text{HClO}_4$  (catalizador) a 25°C.

*3º.- Caso: Acetilación completa sin disolución de las fibras en la mezcla de reacción.*

Aunque en este 3º caso la mezcla de acetilación (anhídrido acético y HClO<sub>4</sub>) se diluye con tolueno, parece conservar su poder de acetilación. Esto es lo que indica el hecho de que las fibras suficientemente activadas alcanzan un grado de acetilación similar al correspondiente del caso 1, en tiempos de reacción también similares. Sin embargo y contrariamente a lo que ocurre caso 1º, en este caso 3º se observa que todas las fibras permanecen totalmente insolubles en la mezcla de reacción. Obviamente, esto es debido a la presencia del tolueno, ya que no es un disolvente de las fibras con cualquier grado de acetilación. Experimentalmente se observa que a medida que la reacción avanza, las fibras se hinchan poco, siempre de manera homogénea (no aparece el fenómeno de ballooning) y las fibras no se disuelven en la mezcla acetilante.

*4º.- Caso: Acetilación de la pared **P1**.*

En este caso se obtienen los mismos resultados que en el caso 2, ya que en los dos casos la activación de las fibras es idéntica y en ambos casos permanecen completamente insolubles en la mezcla de reacción. Este hecho indica claramente que el factor determinante del proceso de acetilación es la etapa de activación.

En los casos anteriores 2º, 3º y 4º, en los que las fibras no se disuelven en la mezcla de reacción, se puede tener una idea del grado de conversión retirando la mezcla de reacción y añadiendo un disolvente. En el 3º caso se utiliza un disolvente de acetato de celulosa (1,4-dioxano) pues las fibras se encuentran muy acetiladas. Por el contrario, en los casos 2º y 4º se emplea un buen disolvente de celulosa (cuoxam) [35, 36], pues en estos casos las fibras únicamente presentan la **P1** acetilada.

En el 3º caso, al sustituir la mezcla acetilante por 1,4-dioxano, se observan los fenómenos de hinchamiento y disolución mediante ballooning convencional al igual que en el caso 1º.

En los casos 2º y 4º, al tratar con cuoxam las fibras con la **P1** selectivamente acetilada, se hinchan y disuelven mediante ballooning no convencional (excepto la **P1** acetilada, que permanece completamente insoluble)

## **Procedimiento experimental:**

Como ejemplo se describe el procedimiento experimental del caso 1º. En los demás casos se procede idénticamente, pero con los reactivos adecuados a cada caso.

**Activación:** Un pequeño fragmento de fibras de albardín se deposita sobre un portaobjetos, se le añaden un par de gotas de ác. acético del 90%, se cubre con un cubreobjetos y se deja durante 10 minutos a 20°C, reponiendo el ác. acético del 90% que pudiese evaporarse durante este tiempo. Despues, por uno de los lados del cubre se succiona el ác. acético con un fragmento de papel de filtro (con cuidado de no contaminar la muestra con fibras de papel). A continuación, se introduce por capilaridad 0.5 mL de ác. acético glacial por un lado del cubre mientras se succiona por el lado opuesto con un fragmento de papel de filtro. Finalmente, se retira el papel de filtro y se deja la preparación en reposo con ác. acético glacial otros 10 minutos a 20°C.

**Acetilación:** Se succiona el acético glacial utilizado en la activación y se introduce por capilaridad la mezcla acetilante (esta mezcla se prepara añadiendo una gota de 25 mg de HClO<sub>4</sub>(60%) a 3 mL de anhídrido acético). Inmediatamente después, se puede seguir directamente el rápido progreso de la reacción de acetilación de las fibras, observando la preparación con el microscopio polarizador a 20°C.

### **7.2.3- Acetilación de fibras de albardín a microescala en el laboratorio.**

Los experimentos de acetilación de las fibras de albardín en la platina del microscopio, se repitieron de la misma manera pero partiendo de 0.5 g de fibras y 10 mL de mezcla acetilante. Los resultados son idénticos en todos los casos, aunque los experimentos en el laboratorio resultan más reproducibles, al poderse controlar mejor las condiciones de reacción.

Los tiempos de acetilación se limitan a 15 minutos para evitar la degradación de las fibras. Una vez acetiladas, se disuelven en cloruro de metíleno y la disolución se deja evaporar para obtener varios filmes o películas de 0.05 mm de grosor y 12 cm de diámetro, que resultan muy robustos. La resistencia mecánica del film indica que las fibras no se han degradado durante su acetilación.

### **Procedimiento experimental:**

**Activación:** 0.5 g de fibras se introducen en un matraz erlenmeyer de 125 mL a temperatura ambiente (20-25°C) y se anota el peso total. Una vez se han extendido formando como un fieltro que ocupa todo el fondo del matraz (6 cm) y una altura de unos 0.5 cm, se cubren con ác. acético glacial (100%) o con ác. acético del 90% (de 30 a 40 mL). Después de 15 minutos se retira en lo posible el ác. acético por gravedad y luego succionando con un cuentagotas hasta que (por pesada) no queden más de 2 g de activante.

Cuando se emplea ác. acético glacial como activante, el proceso de activación concluye aquí. Es decir, cuando el matraz contiene un disco de 0.5 g de fibras activadas humedecidas con 2 g de ác. acético glacial.

Sin embargo, cuando se emplea ác. acético del 90% como activante, el proceso se continua añadiendo al matraz (que ahora contiene los 0.5 g de fibras empapadas con 2 g de ác. acético) de 30 a 40 mL de ác. acético glacial, hasta tener todas las fibras bien cubiertas. Se agita bien el contenido y se deja el matraz durante 15 minutos agitándolo ocasionalmente con la mano (cada 2 o 3 minutos). Después de 15 minutos, se retira en lo posible el ác. acético por gravedad y luego succionando con un cuentagotas hasta que (por pesada) no queden más de 2 g. En este momento el matraz contendrá un disco de 0.5 g de fibras activadas humedecidas con 2 g de ác. acético, listas para acetilar.

**Acetilación:** El proceso de acetilación se realiza con 0.5 gramos de fibras, simplemente extendidas unas sobre otras sin ningún orden (nunca entretejidas), formando un tejido deshilachado o fieltro muy poroso (nunca compactado), donde las fibras pueden moverse bastante libremente y los reactivos pueden circular con toda facilidad entre las fibras. Sin embargo, en este tejido poco compacto, las fibras presentan suficiente cohesión como para formar un fieltro (en forma de disco de unos 6 cm de diámetro y 0.5 cm de espesor). Este disco mantiene su forma durante todas las operaciones de acetilación sin que se produzcan perdidas de fibras.

Al matraz conteniendo el disco de 0.5 g de fibras activadas y húmedas con 2 g de ác. acético glacial, se le añade de golpe 10 mL de mezcla acetilante, a temperatura ambiente. Con un cuentagotas se succiona y se inyecta, alternativamente, la mezcla de reacción a través del fieltro de fibras. Esta operación se repite durante los 10 - 15 minutos que se mantiene la acetilación, asegurándonos de que todas las fibras quedan cubiertas por la corriente continua de mezcla de reacción (corriente creada por la acción del cuentagotas). Si la temperatura de la mezcla se eleva por encima de los 25°C puede sumergirse el matraz en un baño de agua a temperatura ambiente. Hay que tener en cuenta, que el HClO<sub>4</sub> es un catalizador muy activo, no solo en la acetilación, sino también en otras reacciones competitivas de degradación de la celulosa.

**Lavado:** Pasados los 10 - 15 minutos de la reacción de acetilación, la mezcla acetilante se retira succionando con el cuentagotas la mayor cantidad posible (hasta que quedan tan apenas 1-2 gramos humedeciendo las fibras). En este momento se añaden 30 mL de metanol y la mezcla se mantiene con agitación 5 minutos. Pasados estos, se retira la mayor cantidad posible de metanol con el cuentagotas, y se repite otra vez la misma operación de lavado con metanol.

**Secado:** El disco de fibras acetiladas húmedas con metanol, se seca directamente sobre el plato de una estufa a 70°C durante 10 minutos. Ocasionalmente el disco fibroso se comprime, presionándolo con una placa petri contra el plato de la estufa, para dar más cohesión al fielro y evitar la pérdida de fibras durante su manipulación. Después, se seca a vacío (1 mmHg) hasta peso constante (5 minutos).

#### 7.2.4- Acetilación de fibras de albardín con yodo como catalizador.

##### Procedimiento experimental:

**Activación:** La activación se realiza igual que en el apartad anterior 7.2.3.

**Mezcla acetilante:** La mezcla acetilante se prepara disolviendo el catalizador yodo sólido (de 100 a 200 mg) en una mezcla de 20 mL de tolueno y 20 mL de anhídrido acético a temperatura ambiente.

**Acetilación.** A un matraz esmerilado de 50 mL conteniendo 0.5 g de fibras activadas y húmedas con 2 g de ác. acético glacial, se le añaden 40 mL de mezcla acetilante, a temperatura ambiente. Se introduce el matraz en un baño de silicona y se mantiene a reflujo (110°C) con agitación magnética durante 2 horas. Las fibras adquieren una coloración muy obscura casi negra debido al intenso color del yodo.

**Lavado:** Después de 2 horas de acetilación, se enfriá el matraz hasta temperatura ambiente y se vierte todo su contenido en un matraz erlenmeyer de 250 mL que contiene 150 mL de metanol vigorosamente agitado. La agitación se continua durante 5 minutos y después las fibras se recogen mediante filtración a vacío. Las fibras se vuelven a dispersar en 100 mL de metanol con agitación magnética durante 5 minutos y se recogen de nuevo mediante filtración a vacío. Se lavan sobre el filtro con metanol hasta que éste se recoge incoloro. En este momento, las fibras suelen presentar una coloración marrón intensa debido al yodo. Como el metanol no es capaz de extraer mas yodo de las fibras, estas pueden tratarse con una disolución saturada de tiosulfato sódico, pero realmente resulta muy poco efectivo.

**Secado:** Las fibras acetiladas se secan directamente sobre el plato de una estufa a 70°C durante 10 minutos y después a vacío (1 mm<sub>Hg</sub>) hasta peso constante (5 minutos).

### **7.3.- Cianoetilación de fibras de albardín.**

Las fibras de albardín cianoetiladas de una misma muestra se hinchan y disuelven de manera diferente en un mismo disolvente o agente hinchante. Algunas de las fibras cianoetiladas se hinchan y disuelven en cuoxam 20°C mediante ballooming convencional, mientras que otras se hinchan y disuelven mediante ballooming no-convencional. Probablemente, esto es debido a que el método de cianoetilación empleado produce tanto la acetilación de las capas exteriores la pared de las fibras como de las interiores.

Las fibras se cianoetilaron tratándolas primero con NaOH de poder mercerizador y luego con acrilonitrilo a 40 – 45°C. Las fibras con los mayores grados de sustitución parecen presentar una cubierta o capa de poliacrilonitrilo sobre la pared **P1**.

#### **Procedimiento experimental:**

0.5 gramos de fibras se sumergen en 50 mL de NaOH 18% durante una hora a 20°C. Después se decanta la disolución acuosa y las fibras se cubren con 15 mL de acrilonitrilo, manteniéndolas con agitación a 40 – 45°C de una a tres horas según el grado de sustitución deseado. Terminada la reacción, se añaden 100 mL de agua y se neutraliza la mezcla con ác, acético glacial. Las fibras se recogen mediante filtración a vacío y se lavan con agua y después con metanol. Finalmente, se secan directamente sobre el plato de una estufa a 70°C durante 10 minutos y después a vacío (1 mm<sub>Hg</sub>) hasta peso constante (5 minutos).

## Bibliografía.

- 1.- Atlas de la flora de Aragón, Herbario de Jaca, Instituto pirenaico de ecología (CSIC) (Página web accedida mayo 2012)  
<http://www.ipe.csic.es/floragon/ficha.php?genero=Lygeum&especie=spartum&subespecie=&variedad=>
- 2.- Atlas de la flora de Aragón, Herbario de Jaca, Instituto pirenaico de ecología (CSIC) (Página web accedida mayo 2012)  
<http://www.ipe.csic.es/floragon/ficha.php?genero=Stipa&especie=tenacissima&subespecie=&variedad=>
- 3.- Terre et Vie. *L'Alfa : Importance écologique et socioéconomique*. Nº **61–62** (2002). (<http://www.terrevie.ovh.org/Alfa.pdf>)
- 4.- Chiara Mattia, Gian Battista Bischetti, Francesco Gentile. *Biotechnical characteristics of root systems of typical Mediterranean species*. Plant and Soil **278** (2005) 23–32.
- 5.- A. Garcia-Fuentes, C. Salazar, J. A. Torres, E. Cano, F. Valle. *Review of communities of Lygeum spartum L. in the south-eastern Iberian Peninsula (western Mediterranean)*. Journal of Arid Environments **48** (2001) 323-339.
- 6.- Bouzid Nedjimi. *Salt tolerance strategies of Lygeum spartum L.: A new fodder crop for Algerian saline steppes*. Flora **204** (2009) 747–754.
- 7.- Pyrene producciones (PYRENE PV S.L.): Las fibras vegetales. (Página web accedida mayo 2012).  
[http://www.pyrenepv.com/tienda/index.php?cPath=1\\_33\\_39&osCsid=4d2d68dad4e34d7688c74be4bfdec011](http://www.pyrenepv.com/tienda/index.php?cPath=1_33_39&osCsid=4d2d68dad4e34d7688c74be4bfdec011)
- 8.- Z. Marrakchia, R. Khiaria, H. Oueslati, E. Maureta, F. Mhennib. *Pulping and papermaking properties of Tunisian Alfa stems (Stipa tenacissima). Effects of refining process*. Industrial Crops and Products **34** (2011) 1572– 1582.
- 9.- Baya Bouiri, Moussa Amrani. *Elemental chlorine-free bleaching halfa pulp*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry **16** (2010) 587–592.
- 10.- A. Bessadok, S. Marais, F. Gouanve, L. Colasse, I. Zimmerlin, S. Roudesli, M. Métayer. *Effect of chemical treatments of Alfa (Stipatenacissima) fibres on water-sorption properties*. Composites Science and Technology **67** (2007) 685–697.
- 11.- A. Bessadok, S. Roudesli, S. Marais, N. Follain, L. Lebrun. *Alfa fibres for unsaturated polyester composites reinforcement: Effects of chemical treatments on mechanical and permeation properties*. Composites: Part A **40** (2009) 184–195.

- 12.-** Bouiri B, Amrani M. *Production of dissolving grade pulp from alfa*. BioResources **5** (2009) 291–302.
- 13.-** Sami Ben Brahim, Ridha Ben Cheikh. *Influence of fibre orientation and volume fraction on the tensile properties of unidirectional Alfa-polyester composite*. Composites Science and Technology **67** (2007) 140–147.
- 14.-** Marcelo Antunesa, Álvaro Cano, Laia Haurie, José Ignacio Velasco. *Esparto wool as reinforcement in hybrid polyurethane composite foams*. Industrial Crops and Products **34** (2011) 1641–1648.
- 15.-** M. Harche, R. Chadli, A-M. Catesson. *Diversity of cellulose microfibril arrangement in the cell walls of lygeum spartum leaves*. Annals of Botany **65** (1990) 79-86.
- 16.-** N. ZERIAHENE, R. PRAT, R. GOLDBERG, A.M. CATESSON, M. HARCHE-KAID. *Cell Walls of Seed Hairs from Lygeum spartum: Ultrastructure, Composition and Mechanical Properties*. Annals of Botany **81** (1998) 61-66.
- 17.-** M.C. Paiva, I. Ammar, A.R. Campos, R.B. Cheikh, A.M. Cunha. *Alfa fibres: Mechanical, morphological and interfacial characterization*. Composites Science and Technology **67** (2007) 1132–1138.
- 18.-** Ayman Ben Mabrouk, Hamid Kaddami, Sami Boufi, Fouad Erchiqui, Alain Dufresne. *Cellulosic nanoparticles from alfa fibers (*Stipa tenacissima*): extraction procedures and reinforcement potential in polymer nanocomposites*. Cellulose (2012) DOI 10.1007/s10570-012-9662-z
- 19.-** M. Harche, A.M. Catesson. *Cell wall architecture in alfa (*stipa tenacissima L.*) fibres*. IAWA Bulletin n.s., **6 (1)** (1985) 61-69.
- 20.-** Roser M, Heklau H. *Abscission of leaf laminas, an unnoticed factor in tussock grass formation*. Flora **206** (2011) 32–37.
- 21.-** Gamboa PM, Urbaneja F, Olaizola I, Boyra JA, González G, Antepara I, Urrutia I, Jauregui I, Sanz ML. *Specific IgG to Thermoactynomices vulgaris, Micropolispora faeni and Aspergillus fumigatus in building workers exposed to esparto grass (plasterers) and in patients with esparto-induced hypersensitivity pneumonitis*. J. Investig Allergol Clin Immunol. **15** (2005) 17-21.
- 22.-** A. Moreno-Ancilloa, C. Domínguez-Nochea, A. Carmen Gil-Adrados, P.M. Cosmes. *Familiar presentation of occupational hypersensitivity pneumonitis caused by aspergillus-contaminated esparto dust*. Allergol et Immunopathol **31(5)** (2003) 294-6.
- 23.-** Jonas Brändström, Stig L. Bardage, Geoffrey Daniel, Thomas Nilsson. *The structural organization of the S1 cell wall layer of norway spruce tracheids*. IAWA Bulletin n.s., **24 (1)** (2003) 27-40.

- 24.-** S. Alix, L. Lebrun, S. Marais, E. Philippe, A. Bourmaud, C. Baley, C. Morvan. *Pectinase treatments on technical fibres of flax: Effects on water sorption and mechanical properties.* Carbohydrate Polymers **87** (2012) 177– 185.
- 25.-** Cecile Sigoillot, Susana Camarero, Teresa Vidal, Eric Record, Michele Asther, Marta Perez-Boada, Maria Jesus Martinez, Jean-Claude Sigoillot, Marcel Asther, Jose F. Colom, Angel T. Martinez. *Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps.* Journal of Biotechnology **115** (2005) 333–343.
- 26.-** S. J. Deteresa, S. R. Allen, R. J. Farris, R. S. Porter. *Compressive and torsional behaviour of Kevlar 49 fibre.* J. Mater. Sci. **19** (1) (1984) 57-72.
- 27.-** Mark Hughes. *Defects in natural fibres: their origin, characteristics and implications for natural fibre-reinforced composites.* J Mater Sci **47** (2012) 599–609.
- 28.-** Lisbeth G. Thygesen, Michaela Eder, Ingo Burgert. *Dislocations in single hemp fibres—investigations into the relationship of structural distortions and tensile properties at the cell wall level.* J Mater Sci **42** (2007) 558–564.
- 29.-** Marja-Sisko, Ilvessalo-Pfäffli. *Fiber atlas: identification of papermaking fibers.* Springer 1995.
- 30.-** Ray F. Evert. *Esau's plant anatomy :meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function and development.* John Wiley & Sons 2006.
- 31.-** T. A. Gorshkova, O. P. Gurjanov, P. V. Mikshina, N. N. Ibragimova, N. E. Mokshina, V. V. Salnikov, M. V. Ageeva, S. I. Amenitskii, T. E. Chernova, S. B. Chemikosova. *Specific Type of Secondary Cell Wall Formed by Plant Fibers.* Russian Journal of Plant Physiology **57** (3) (2010) 328–341.
- 32.-** K. Charleta, J.P. Jernot, S. Eve, M. Gomina, J. Bréard. *Multi-scale morphological characterisation of flax: From the stem to the fibrils.* Carbohydrate Polymers **82** (2010) 54–61.
- 33.-** Rachel A. Burton, Michael J. Gidley, Geoffrey B. Fincher. *Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls.* Nature Chemical Biology **6** (2010) 724-732.
- 34.-** Monika S. Doblin, Filomena Pettolino, Antony Bacic. *Plant cell walls: the skeleton of the plant world.* Functional Plant Biology, **37** (2010) 357–381.
- 35.-** Cuissinat C, Navard P. *Swelling and dissolution of cellulose, Part III: plant fibres in aqueous systems.* Cellulose **15** (2008) 67–74.
- 36.-** Cuissinat C, Navard P, Heinze T. *Swelling and dissolution of cellulose, Part V: cellulose derivatives fibres in aqueous systems and ionic liquids.* Cellulose **15** (2008) 75-80.

- 37.-** Le Moigne N, Montes E, Pannetier C, Hofte H, Navard P. *Gradient in dissolution capacity of successively deposited cell wall layers in cotton fibres.* Macromol Symp **262** (2008) 65–71.
- 38.-** Le Moigne N, Spinu M, Heinze T, Navard P. *Restricted dissolution and derivatization capacities of cellulose fibers under uniaxial elongational stress.* Polymer **51** (2010) 447–453.
- 39.-** Nicolas Le Moigne, Jerome Bikard, Patrick Navard. *Rotation and contraction of native and regenerated cellulose fibers upon swelling and dissolution: the role of morphological and stress unbalances.* Cellulose **17** (2010) 507–519.
- 40.-** Monica Spinu, Nuno Dos Santos, Nicolas Le Moigne, Patrick Navard. *How does the never-dried state influence the swelling and dissolution of cellulose fibres in aqueous solvent?* Cellulose **18** (2011) 247–256.
- 41.-** G. Mangenot. M. Raison. *Microscopical studies on the swelling of native, bleached and nitrated cellulose fibers.* The Botanical Review **17 (8)** (1951) 555-628.
- 42.-** Tripp VW, Rollins ML. *Morphology and chemical composition of certain components of cotton fiber cell wall.* Anal Chem **24** (1952) 1721–1728.
- 43.-** Warwicker JO, Jeffries R, Colbran RL, Robinson RN. *A review of the literature on the effect of caustic soda and other swelling agents on the fine structure of cotton.* Shirley Institute Pamphlet No. 93, St Ann's Press, England (1966).
- 44.-** Chanzy, H, Noe, P, Paillet, M, Smith, P. *Swelling and dissolution of cellulose in amine oxide/water systems.* J. Appl. Polymer Sci. **37** (1983) 239–259.
- 45.-** MICHAEL MICHAEL, ROGER N. IBBETT, OLIVER W. HOWARTH. *Interaction of cellulose with amine oxide solvents.* Cellulose **7** (2000) 21–33.
- 46.-** Kristina Jardeby, Ulf Germgard, Bjorn Kreutz, Thomas Heinze, Ute Heinze, Helena Lennholm. *The influence of fibre wall thickness on the undissolved residuals in CMC solutions.* **12** (2005) 167–175.
- 47.-** Burchard W, Habermann N, Klufers P, Seger B, Wilhelm U. *Cellulose in Schweizer's reagent, a stable, polymeric metal-complex with high chain stiffness.* Angewandte Chemie International Edition in English **33 (8)** (1994) 884-887.
- 48.-** Kay Saalwachter, Walther Burchard, Peter Klufers, G. Kettenbach, Peter Mayer, Dieter Klemm, Saran Dugarma. *Cellulose Solutions in Water Containing Metal Complexes.* Macromolecules **33** (2000) 4094-4107.
- 49.-** Xue Li, Lope G. Tabil, Satyanarayan Panigrahi. *Chemical Treatments of Natural Fiber for Use in Natural Fiber-Reinforced Composites: A Review.* J Polym Environ **15** (2007) 25–33.

- 50.-** Giovanna Frisoni, Massimo Baiardo, Mariastella Scandola. *Natural Cellulose Fibers: Heterogeneous Acetylation Kinetics and Biodegradation Behavior.* Biomacromolecules **2** (2001) 476-482.
- 51.-** V. Tserki, N.E. Zafeiropoulos, F. Simon, C. Panayiotou. *A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres.* Composites: Part A **36** (2005) 1110-1118.
- 52.-** A. K. Bledzki, A. A. Mamun, M. Lucka-Gabor, V. S. Gutowski. *The effects of acetylation on properties of flax fibre and its polypropylene composites.* eXPRESS Polymer Letters **2(6)** (2008) 413-422.
- 53.-** Ludmila A. Ramos, Daniella L. Morgado, Omar A. El Seoud, Valdineia C. da Silva, Elisabet Frollini. *Acetylation of cellulose in LiCl-N,N-dimethylacetamide: first report on the correlation between the reaction efficiency and the aggregation number of dissolved cellulose.* Cellulose **18** (2011) 385-392.
- 54.-** Moyeenuddin A. Sawpan, Kim L. Pickering, Alan Fernyhough. *Effect of various chemical treatments on the fibre structure and tensile properties of industrial hemp fibres.* Composites: Part A **42** (2011) 888-895.
- 55.-** Igor Maria De Rosa, José M. Kenny, Mohd. Maniruzzaman, Md. Moniruzzaman, Marco Monti, Debora Puglia, Carlo Santulli, Fabrizio Sarasini. *Effect of chemical treatments on the mechanical and thermal behaviour of okra (*Abelmoschus esculentus*) fibres.* Composites Science and Technology **71** (2011) 246-254.
- 56.-** Christophe Baley, Frederic Busnel, Yves Grohens, Olivier Sire. *Influence of chemical treatments on surface properties and adhesion of flax fibre-polyester resin.* Composites: Part A **37** (2006) 1626-1637.