

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Relación entre edad del árbol y su composición química en *Pinus radiata* (D.Don) crecido en Chile y su importancia para la producción de bioetanol

Alexander Berrocal Jiménez¹
Juanita Freer Calderón²
Jaime Baeza Hernández²
Jaime Rodríguez Gutiérrez²
Miguel Espinosa Bancalari²

Resumen

En la presente investigación se determinó la composición química de árboles de *Pinus radiata* (D.Don) de diferentes categorías de edad, para lo cual se utilizó un método de hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA). Se encontraron diferencias significativas en la composición química asociadas a la edad. Los valores obtenidos son necesarios para determinar la factibilidad de utilizar este recurso biomásico, a edades en que los contenidos de azúcares resultan tanto cuantitativamente, como cualitativamente favorables para producir biocombustibles.

Palabras claves: Hidrólisis ácida, TFA, Azúcares de la madera, *Pinus radiata*, Biocombustibles, Chile.

Abstract

Relationship between tree age and chemical composition for *Pinus radiata* grown in Chile and their importance for the production of bioethanol. This investigation determined the chemical composition of *Pinus radiata* trees of different age classes. In order to achieve this, a hydrolysis with trifluoroacetic acid method was used. Significant differences in chemical composition associated with age were found. The values obtained are necessary in order to determine the feasibility of utilising this biomass resource at ages where sugar content is both quantitatively and qualitatively favourable for the production of biofuels.

Key words: Acid hydrolysis, Trifluoroacetic acid, Wood sugars, *Pinus radiata*, Biofuels, Chile.

¹ Instituto Tecnológico de Costa Rica. aberrocal@itcr.ac.cr

² Universidad de Concepción, Chile. jfreer@udec.cl, jbaeza@udec.cl, jrodrigu@udec.cl, mepinos@udec.cl

INTRODUCCIÓN

En los últimos 25 años ha habido un gran interés en el potencial de producir etanol a partir de biomasa y utilizarlo como combustible (Saddler y Gregg, 1998). La producción de biomasa en el mundo ha sido estimada en más de 170 billones de toneladas al año, con 70% en los bosques, convirtiendo al material lignocelulósico en el componente más importante de este recurso (Skog y Rosen, 1997). En la madera cerca del 50% lo constituye la celulosa, razón por la cual se considera la principal fuente de materia prima para la obtención de etanol. Otros polisacáridos presentes en la madera son las hemicelulosas, que están en menor proporción (20-25%) y también pueden ser utilizados en el proceso de obtención de bioetanol (Goldstein, 1992); los análisis económicos han mostrado que el éxito en los procesos de conversión de material lignocelulósico a bio-combustibles está determinado por la utilización efectiva de todos los componentes químicos (Lee y Caskey, 1983; Galbe y Zacchi, 2002).

Previo a la implementación de un proyecto de producción de bioetanol a gran escala, es necesario conocer la composición química de la materia prima (Schaffeld, 1994; Johnson *et al* 2000) y en el caso de que se desee utilizar un recurso renovable y químicamente heterogéneo como la madera se requiere considerar los diversos factores que determinan la abundancia, tanto cuantitativa como cualitativa, de los componentes químicos que se desean utilizar (Baeza y Freer, 2001). En el caso específico del uso del material lignocelulósico para la obtención de bioetanol, es además importante considerar la composición de los azúcares, debido a que sólo las hexosas son fácilmente fermentables, mientras que las pentosas requieren el uso de microorganismos genéticamente modificados (Wyman, 2001).

Entre los factores que se deben considerar están la especie forestal, la edad del árbol, la selección genética, la región geográfica donde éste crece y las prácticas silviculturales a las que se ven sometidas las plantaciones forestales (Fengel y Wegener, 1979).

Este estudio tiene como objetivo cuantificar la composición química de la madera de *P. radiata* en árboles de diferentes edades, utilizando un método modificado de hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras de madera se recolectaron en plantaciones de *P. radiata* en el sector de San Pedro de la Paz, Concepción, Chile (VIII Región), se realizó una selección de rodales por categorías de edad (1-3, 4-6, 7-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30 y más de 30 años). Se escogieron al azar 3 árboles en cada uno de los rodales, de cada uno de los árboles se extrajo una galleta de madera a la altura del diámetro (1,30 m).

Tratamientos de las muestras

Las galletas se dejaron secando al aire por un periodo de un mes y medio, luego se astillaron y posteriormente se molieron, para lo cual se empleó un molino Retsch SM1. Las muestras se tamizaron a un tamaño de partícula menor de 0,35 mm (45 mesh) y superior a 0,25 mm (60 mesh), de acuerdo a la norma Tappi 204 om-88. El material se colocó en bolsas de polietileno, selladas al vacío para evitar que la madera ganara humedad o se contaminara con hongos, finalmente se almacenó a temperatura ambiente para su posterior análisis químico.

Determinación del porcentaje de extraíbles en la madera

A cada una de las muestras se les determinó el contenido de humedad en una termobalanza, de acuerdo a la norma Tappi 264 om-97. La madera se extrajo en un sistema soxhlet por 5 horas, con un reciclado de solvente de 6 veces por hora, utilizando 150 ml de una mezcla de etanol tolueno en una proporción 1:2 (v/v). Después de la extracción con etanol tolueno, la muestra de madera se filtró en un embudo Büchner con vacío para remover el exceso de solvente y se lavó con etanol para remover el tolueno. La muestra se colocó nuevamente en el aparato soxhlet y se extrajo con 150 ml de etanol, repitiéndose el mismo procedimiento señalado anteriormente. Nuevamente se transfirió la muestra al embudo Büchner para remover el exceso de solvente con vacío, tanto el dedal de extracción como la muestra se lavaron con agua destilada para remover el etanol. Se colocó la muestra en un erlenmeyer de 1000 ml, se le agregó 500 ml de agua destilada, se calentó en un baño de agua por 1 hora, posteriormente se filtró en un embudo Büchner y se lavó con abundante agua destilada. La muestra de madera extraída fue secada al aire por varios días, removiéndola con una espátula para que el secado fuera homogéneo y luego se almacenó en una bolsa de polietileno, sellada al vacío para su posterior análisis. Ambos extractos orgánicos se mezclaron en un balón de 250 ml y el solvente se removió parcialmente en un rotavapor, luego se transfirió a un balón de 50 ml previamente tarado; se eliminó el solvente hasta sequedad. El residuo se colocó en una estufa durante 1 hora a 105 ± 3 °C, finalmente se dejó enfriar en un desecador y se pesó con una precisión de 0.0001 g. Se realizó un blanco evaporando 150 ml de solvente en un balón tarado, después se pesó el residuo con una precisión de 0.0001 g. El peso del extracto fue corregido con el blanco por diferencia de peso.

Método de hidrólisis

Se implementó un método de hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA); este ácido es un buen solvente de la celulosa, sin embargo, este tipo de hidrólisis debe ser optimizada dependiendo del material con el que se está trabajando (Fengel y Wegener, 1979). Se colocó 100 mg de madera libre de extraíbles en contacto con 8,1 ml de TFA concentrado durante 12 horas a temperatura ambiente. En la primera etapa de hidrólisis se dejó la solución en reflujo a 97 °C durante 1 hora. En la segunda etapa de hidrólisis se diluyó el TFA al 80% y se reflujo a 97 °C por 15 minutos, después se diluyó el TFA al 30% y se dejó en reflujo a 97 °C por 2 horas. Se diluyó el TFA al 6% y se autoclavó a 100 °C por dos horas, completada la fase de hidrólisis, el hidrolizado se separó del residuo (lignina) a través de un crisol con tamaño de poro 4 previamente tarado. El hidrolizado fue colocado en un balón y se evaporó el TFA en rotavapor. Se adicionó agua al balón con el hidrolizado y se rotavaporeó varias veces, hasta alcanzar un pH de 4. El residuo de azúcares se disolvió en 4 ml de agua y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Análisis estadístico

Para los análisis químicos de las muestras de diferentes categorías de edad se trabajó con 8 edades diferentes, se contó con 3 árboles para cada una de ellas. Los análisis se realizaron en triplicado. Se procedió a hacer un análisis de varianza, a través de una regresión lineal cuadrática, con un nivel de confianza del 95%, para cada uno de los componentes químicos de la madera y así identificar si existen diferencias significativas; se tomó como población para el análisis las 24 muestras (3 árboles de cada una de las 8 categorías de edad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de la madera

En el cuadro 1 se muestra la proporción de los componentes químicos de la madera, obtenidos en árboles de *P. radiata* de diferentes categorías de edad.

Cuadro 1. Proporción de celulosa, hemicelulosa, lignina (TFA) y extraíbles obtenidos en árboles de *Pinus radiata* de diferentes categorías de edad.

Categoría de edad (años)	Celulosa	Hemicelulosas	Lignina	Extraíbles
	(%)			
1 – 3	31,05	25,99	38,96	4,65
4 – 6	31,76	24,15	38,81	2,08
7 – 10	37,83	24,26	32,46	2,53
11 – 15	41,52	21,41	31,16	1,85
16 – 20	41,48	21,73	29,39	1,74
21 – 25	42,51	22,90	30,36	2,00
26 – 30	40,51	25,01	33,76	2,68
> 30	36,36	23,49	34,89	2,56

* Sin incluir ácidos glucorónicos ni grupos acetilo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que la proporción de celulosa aumentó desde la categoría de edad de 1 a 3 años (31,05%) a la de 21 a 25 años (42,51%), disminuyendo en las categorías siguientes (40,51% y 36,36% respectivamente). Por su parte el porcentaje de hemicelulosa disminuyó desde las edades más jóvenes (1 a 3 años), hasta las edades intermedias (16 a 20 años), aumentando nuevamente en las categorías de 21 a 25 años y 26 a 30 años. El porcentaje de hemicelulosa obtenido no incluye a los grupos acetilo, ni a los ácidos glucorónicos.

La proporción de lignina disminuyó desde la categoría de edad de 1 a 3 años (38,96%) a la de 21 a 25 años (30,36%), para aumentar nuevamente en las categorías posteriores: Se observó una relación inversa entre el porcentaje de celulosa y lignina en las diferentes categorías de edad.

El porcentaje de extraíbles obtenido disminuyó desde la categoría de 1 a 3 años (4,65%) a la de 16 a 20 años (1,74%), aumentando en las edades subsiguientes; su comportamiento fue similar al mostrado por la proporción de hemicelulosas en las diferentes categorías de edad.

Proporción de azúcares

Glucosa

Los resultados obtenidos muestran que la proporción de glucosa en la madera de *P. radiata* tiende a aumentar con la edad. En los primeros años (1-5) el porcentaje encontrado es cercano a 40%, posteriormente el valor se incrementó a 50% (11-15 años), dicho porcentaje permanece constante hasta los 30 años, luego se da una leve disminución a 45% en la categoría de más de 30 años (Figura 1).

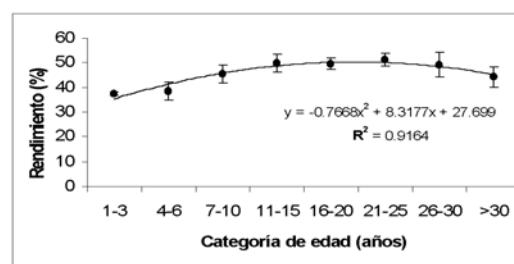


Figura 1. Porcentaje de glucosa encontrado en árboles de *Pinus radiata* de diferentes categorías de edad, a través del método de hidrólisis con TFA optimizado.

Estos valores son congruentes con lo reportado por la literatura; la madera juvenil contiene menos glucosa que la madera adulta (Saka, 2001). Así mismo, se ha encontrado mayor cantidad de

glucosa en árboles de *P. radiata* de 21 a 25 años, en comparación con los de 1 a 5 años (Uprichard y Lloyd, 1980).

Xilosa

La proporción de xilosa en las coníferas es inferior a 10%, en la Figura 2 se muestra las cantidades de xilosa encontrada en árboles de *P. radiata* de diferentes edades.

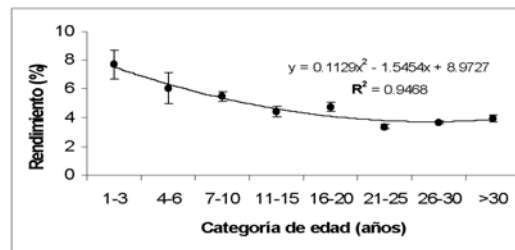


Figura 2. Porcentaje de xilosa encontrado en árboles de *Pinus radiata* de diferentes categorías de edad, a través del método de hidrólisis con TFA optimizado.

El porcentaje de xilosa tiende a ser mayor en las categorías de edad más jóvenes, esto se debe a que en la madera juvenil se presenta mayor cantidad de ésta en comparación con la madera adulta (Saka, 2001). En la categoría de edad de 1-3 años se registró una proporción de xilosa cercana a 8%, ésta disminuyó a 4,5% en las categorías de edad intermedias (alrededor de los 15 años), para finalmente ser alrededor de 4% en las edades adultas (más de 30 años).

Galactosa

La galactosa se encuentra en muy baja proporción en la madera de *P. radiata*, en la Figura 3 se muestra las cantidades encontradas en árboles de diferentes edades.

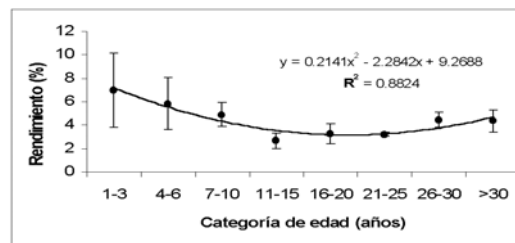


Figura 3. Porcentaje de galactosa encontrado en árboles de *Pinus radiata* de diferentes categorías de edad, a través del método de hidrólisis con TFA optimizado.

Se observa que la cantidad de galactosa tiende a disminuir de 1 hasta los 15 años, pasando de 6% a 2,6%, para luego incrementar nuevamente, alcanzando cerca de 4,5% a los 30 años. A la edad de 1 y 5 años se obtuvieron valores de galactosa de 10% y 8% respectivamente, porcentajes que son asociados a la alta concentración de madera juvenil que se encuentra en árboles de estas categorías de edad (Saka, 2001).

Arabinosa

La arabinosa al igual que la galactosa se encuentra presente en la madera de *P. radiata* en pequeñas cantidades (menos de un 3%), en la Figura 4 se grafica su proporción a diferentes edades.

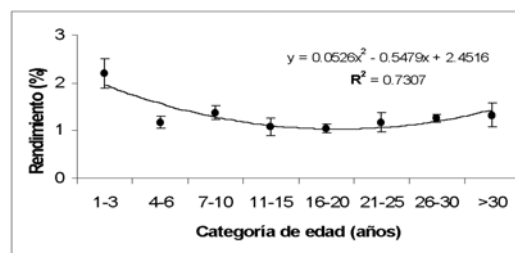


Figura 4. Porcentaje de arabinosa encontrado en árboles de *Pinus radiata* de diferentes categorías de edad, a través del método de hidrólisis con TFA optimizado.

La distribución del porcentaje de arabinosa en las diferentes categorías de edad, es similar a la mostrada por la galactosa, se da una disminución en su proporción desde las edades más jóvenes, hasta los 15 años (2% y 1% respectivamente); para posteriormente incrementar en las edades adultas (1,3%).

Manosa

La manosa es el segundo azúcar en importancia dada su proporción en la madera de *P. radiata*, en la Figura 5 se muestra los porcentajes encontrados en las diferentes categorías de edad analizadas.

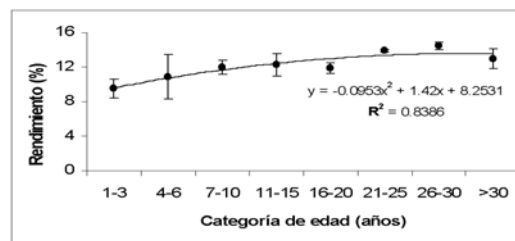


Figura 5. Porcentaje de manosa encontrado en árboles de *Pinus radiata* de diferentes categorías de edad, a través del método de hidrólisis con TFA optimizado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que la proporción de manosa en la madera de *P. radiata* tiende a aumentar conforme el árbol pasa de la edad juvenil a la adulta, esto se debe a dos razones principales: la madera juvenil presenta menor porcentaje de manosa en comparación con la madera adulta, además los árboles de categorías de edad inferiores tienen mayor porcentaje de madera de compresión en relación con la proporción de madera normal y la madera de compresión se caracteriza por presentar menor cantidad de manosa que la madera normal (Saka, 2001).

En los árboles analizados, se obtuvo que la proporción de manosa aumenta de 9,5% en la categoría de edad 1 a 3 años, hasta alrededor de 14,5 % en la categoría 26 a 30 años, posteriormente tiende a disminuir en los árboles de más de 30 años.

En el cuadro 2 se muestran los valores promedio de la proporción de azúcares encontrados en muestras de madera de *P. radiata* de diferentes categorías de edad.

Cuadro 2. Proporción de azúcares encontradas en muestras de madera de *Pinus radiata* de diferentes categorías de edad.

Categoría de edad (años)	Azúcares (%)				
	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa
1 – 3	37,21	7,69	7,01	2,20	9,48
4 – 6	38,39	6,03	5,82	1,17	10,87
7 – 10	45,46	5,46	4,88	1,37	11,99
11 – 15	49,63	4,40	2,67	1,08	12,25
16 – 20	49,48	4,72	3,25	1,04	11,87
21 – 25	51,19	3,33	3,19	1,18	13,87
26 – 30	49,14	3,64	4,43	1,26	14,44
> 30	43,99	3,92	4,39	1,33	12,89

Análisis estadístico

En el cuadro 3 se resumen los análisis de varianza realizados para cada uno de los componentes químicos de la madera.

Cuadro 3. Análisis de varianza para los componentes químicos de la madera de *Pinus radiata*, de diferentes categorías de edad.

Parámetro	Fuente de variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor -p
Celulosa	Regresión	2	388,399	194,200	22,493	0,000
	Residuo	21	181,309	8,634		
Hemicelulosa	Regresión	2	32,879	16,439	9,521	0,001
	Residuo	21	36,261	1,727		
Lignina	Regresión	2	229,984	114,992	14,840	0,000
	Residuo	21	162,721	7,749		
Extraíbles	Regresión	2	12,498	6,249	15,729	0,000
	Residuo	21	8,343	0,397		
Glucosa	Regresión	2	552,806	276,403	24,671	0,000
	Residuo	21	235,276	11,204		
Xilosa	Regresión	2	41,616	20,808	55,469	0,000
	Residuo	21	7,878	0,375		
Galactosa	Regresión	2	40,622	20,311	10,359	0,001
	Residuo	21	41,177	1,961		
Arabinosa	Regresión	2	2,001	1,000	14,734	0,000
	Residuo	21	1,426	0,068		
Manosa	Regresión	2	42,782	21,391	13,252	0,000
	Residuo	21	33,898	1,614		

El análisis de varianza realizado, muestra que hay diferencia significativa asociada a la edad en todos los componentes químicos de la madera (Cuadro 3).

CONCLUSIÓN

La composición química de la madera de *P. radiata* presenta variaciones asociadas con la edad de los árboles, estas variaciones son estadísticamente significativas, las cuales junto con las diferencias encontradas entre árboles de una misma edad, muestran la variabilidad existente en la proporción de los componentes químicos de la madera. Estas variaciones en la composición química de la madera deben ser tomadas en cuenta para la selección del material óptimo para producir bioetanol, el cual debe presentar baja proporción de lignina, alta concentración de azúcares, principalmente de hexosas, debido a que son fácilmente fermentables; además dicho material debe provenir de categorías de edad relativamente jóvenes, dado que el éxito de producir etanol a partir de material lignocelulósico, depende de la factibilidad de establecer turnos de cosecha de corta rotación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a FONDECYT (Proyecto N° 1020161), a la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción (Proyecto DIUC 201.023.027-10 y 201.023.028-1.4), a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción y al Instituto Tecnológico de Costa Rica.

BIBLIOGRAFÍA

- Baeza, J.; Freer, J. 2001. Chemical characterization of wood and its components. In Wood and cellulosic chemistry. Hon, D.N.S. and Shiraishi, N. (Eds.). New York, US., Marcel Dekker. p. 275-384.
- Fengel, D.; Wegener, G. 1979. Hydrolysis of polysaccharides with trifluoroacetic acid (TFA) and its application to rapid wood and pulp analysis. In Hydrolysis of cellulose: mechanism of enzymatic and acid catalysis.. Brown, R.D. Jr. and Jurasek, L. (Eds.). Advances in Chemistry Series. 181:145-158.
- Galbe, M.; Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiological Biotechnology. 59:618-628.
- Goldstein, I.S. 1992. Recent developments in cellulose hydrolysis by concentrated acids. In 2nd National Symposium on Production of New Proteins and Utilization of Unexplored Resources. (1985 Lisboa, Portugal). .Lisboa. Portugal. p.10.
- Harris, J.M. 1981. Wood quality of radiata pine. Appita. 35:211-215.
- Johnson, D.K.; et al. 2000. Study of compositional changes in biomass feedstocks upon storage. Changes in Biomass Feedstocks. Golden, CO.,US, National Renewable Energy Laboratory. 20 p
- Lee, Y.; Mc Caskey, A. 1983. Hemicellulose hydrolysis and fermentation of resultant pentoses to ethanol. Tappi Journal. 66 (5):102-107.
- Saddler, J.N.; Gregg, D.J. 1998. Ethanol production from forest wastes. In Forest Product Biotechnology. Bruce, A. and Palfreyman, J. W. (Eds.). London, UK, Taylor and Francis Inc. p.183-195.
- Saka, S. 2001. Chemical composition and distribution. In Wood and cellulosic chemistry. Hon, D.N.S. and Shiraishi, N. (Eds.). New York, US, Marcel Dekker. p.51-82.
- Schaffeld, G. 1994. El Material lignocelulósico. In Etanol de lignocelulósicos. Tecnología y perspectivas. Cunningham, R.; López, G. (Eds). España, Universidad de Santiago de Compostela. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). p.15-34.
- Skog, K.; Rosen, H. 1997. United States wood biomass for energy and chemicals: Possible changes in supply, end uses and environmental impacts. Forest Products Journal. 47 (2):63-69.
- Uprichard, J.M.; Lloyd, J.A. 1980. Influence of tree age on the chemical composition of radiata pine. New Zealand Journal of Forestry Science. 10 (3):551-557.
- Wyman, C. 2001. Twenty years of trials, tribulations and research progress in bioethanol technology. In Proceedings of The 22nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, (2001, Gatlinburg, Tennessee. Toota, NJ.). Davidson, B.; McMillan, J.; Finkelstein, M. (Eds). US, Humana Press Applied Biochemistry and Biotechnology. p. 5-21.