



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

EVALUACIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DEL PASTO TOLEDO (*Bracharia brizantha* CIAT 26110) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

MARIO ALBERTO SANTIAGO ORTEGA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

JUNIO DE 2015


La presente tesis titulada: “**Evaluación de la biomasa lignocelulósica del pasto Toledo (*Brachiaria brizantha* CIAT 26110), para la producción de bioetanol**” realizada por el alumno: **Mario Alberto Santiago Ortega**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


Ph. D. ADRIÁN R. QUERO CARRILLO

ASESOR


Ph. D. JOSÉ A. HONORATO SALAZAR

ASESOR


Ph. D. ALFONSO HERNÁNDEZ GARAY

ASESOR


Ph. D. CÁNDIDO LÓPEZ CASTAÑEDA

ASESOR


Ph. D. ISAIÁS LÓPEZ GUERRERO

Montecillo, Texcoco, México, Junio de 2015.

EVALUACIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DEL PASTO TOLEDO (*Brachiaria brizantha* 26110) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Mario Alberto Santiago Ortega
Colegio de Postgraduados, 2015.

RESUMEN GENERAL

El objetivo del presente estudio fue evaluar la biomasa de *Urochloa brizantha* (CIAT 26110) cv. Toledo, como materia prima para la producción de bioetanol. Se determinó la producción anual de biomasa, poder calorífico, composición química, análisis inmediato y rendimiento teórico de bioetanol, en seis frecuencias de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del rebrote). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$). El mayor contenido de celulosa y hemicelulosa ($p<0.05$) fue 44.1 y 30.1 %, a 150 y 60 días de rebrote, respectivamente. El menor contenido de lignina ($p<0.05$) de 16.2 %, a 60 días de corte. El mayor contenido de cenizas y proteína ($p<0.05$) 9 y 8 %, a 30 días de corte, respectivamente. El poder calorífico no difiere entre frecuencias de corte ($p>0.05$). La frecuencia de corte a 180 días, acumuló la mayor producción de biomasa ($p<0.05$) con $27.95 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$; el mayor porcentaje de holocelulosa ($p<0.05$) con 73.6 %; y el mayor ($p<0.05$) rendimiento teórico de bioetanol con $281.3 \text{ L t MS}^{-1}$. Las características químicas y rendimiento de biomasa destacan el potencial de *Urochloa brizantha* CIAT 26110, para producir bioetanol en áreas tropicales.

Palabras clave: *Brachiaria brizantha*, bioetanol, composición química, análisis inmediato, poder calorífico.

BIOMASS LIGNOCELLULOSIC EVALUATION OF TOLEDO GRASS (*Brachiaria brizantha* CIAT 26110) FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Mario Alberto Santiago Ortega
Colegio de Postgraduados, 2015.

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the biomass of *Urochloa brizantha* (CIAT 26110) cv. Toledo, as feedstock for bioethanol production. The annual biomass yield, calorific value, chemical composition, proximate analysis, and theoretical ethanol yield were determined at six cutting frequencies (30, 60, 90, 120, 150, and 180 days after regrowth). The data were analyzed using the SAS GLM procedure and the average values of treatments were compared with Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The higher content of cellulose and hemicellulose ($p < 0.05$) was 44.1 and 30.1%, at 150 and 60 days after cutting, respectively. The lower lignin content ($p < 0.05$) was 16.2 %, at 60 days of cutting. The higher content of ash and protein ($p < 0.05$) were 9 and 8 %, at 30 days of cutting, respectively. The gross calorific value was not different among cutting frequencies ($p < 0.05$). The cutting frequency of 180 days gave the highest ($p < 0.05$) accumulated biomass yield with 27.95 t ha⁻¹ yr⁻¹; greater holocelulosa content ($p < 0.05$) with 73.6 %; and the highest theoretical ethanol yield ($p < 0.05$) with 281.3 L t DM⁻¹. The chemical characteristics and biomass yield highlight the potential of *Urochloa brizantha* CIAT 26110 for bioethanol production in tropical areas.

Keywords: *Brachiaria brizantha*, bioethanol, chemical composition, proximate analysis, calorific value.

DEDICATORIA

A Mónica, Mariana, Roberto y Valeria.

A todos los seres vivos que dignifican la vida.

AGRADECIMIENTOS

Colegio de Postgraduados (COLPOS).

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Al Fondo Sectorial CONACYT-SENER Sustentabilidad Energética, a través del Proyecto, No. 151370 por el apoyo financiero para la realización de los análisis composición química e inmediato y de poder calorífico.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 Objetivo General	4
1.2.2 Objetivos particulares.....	4
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Características de Pasto Toledo (<i>Brachiaria brizantha</i>; Sin. <i>Urochloa brizantha</i>; CIAT 26110).....	4
2.1.1 Aspectos generales	4
2.1.2 Adaptación y rendimiento de forraje.....	5
2.2 Biomasa Lignocelulósica: Composición y Estructura.....	5
2.2.1 Biomasa Lignocelulósica.....	5
2.2.2 Celulosa	7
2.2.3 Hemicelulosa	8
2.2.4 Lignina	9
2.2.5 Extractivos	13
2.2.6 Proteína	13
2.2.7 Pectinas	13
2.2.8 Análisis inmediato	14
2.3 Poder calorífico	16
2.4 Bioetanol.....	17
2.4.1 Usos.....	17
2.5 Implicaciones ambientales.....	18
2.6 LITERATURA CITADA.....	19
CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE PASTO TOLEDO (<i>Brachiaria brizantha</i> Sin. <i>Urochloa brizantha</i> CIAT 26110) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	29

3.1 RESUMEN	29
3.2 INTRODUCCIÓN	31
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.3.1 Localización del área de estudio	32
3.3.2 Establecimiento de parcelas	32
3.3.3 Rendimiento de biomasa	33
3.3.4 Composición química.....	33
3.3.5 Análisis inmediato	37
3.3.6 Poder calorífico	38
3.3.7 Estimación del rendimiento teórico de bioetanol	39
3.3.8 Análisis estadístico.....	41
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.4.1 Rendimiento de biomasa	41
3.4.2 Poder calorífico y contenido de humedad	43
3.4.3 Composición química.....	44
3.4.4 Análisis inmediato	51
3.4.5 Rendimiento teórico a bioetanol.....	54
3.5 CONCLUSIONES	58
3.6 LITERATURA CITADA.....	59
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES	68

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
	Cuadro 1. Composición química de biomosas lignocelulósicas.	6
	Cuadro 2. Caracterización de azúcares en pastos.	9
	Cuadro 3. Caracterización energética de pasto Toledo a seis frecuencias de corte. .	44
	Cuadro 4. Composición química de pasto Toledo a seis frecuencias de corte.	50

Cuadro 5. Análisis inmediato de pasto Toledo a seis frecuencias de corte..... 53

Cuadro 6. Rendimiento de biomasa y producción de bioetanol de pasto Toledo a seis frecuencias de corte. 54

Cuadro 7. Rendimiento de bioetanol de pasto Toledo y otras fuentes de biomasa ... 55

Cuadro 8. Matriz de coeficientes de correlación entre frecuencia de corte, rendimiento de biomasa, composición química y análisis inmediato. 57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1.	Rendimiento anual de biomasa seca de pasto Toledo a seis frecuencias de corte.	42

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La demanda de energía aumenta a medida que lo hace la industrialización y crecimiento poblacional. El modelo económico actual depende principalmente de combustibles fósiles. La prospección que se conjetura es el agotamiento paulatino de reservas petrolíferas y su consecuente sustitución. Lo correspondiente a los centros de investigación y sociedad interesada es desarrollar, impulsar y utilizar fuentes de energía renovable que sustituyan de manera eficaz a los combustibles fósiles. Es menester el desarrollo y aplicación de políticas públicas, para volver realidad el uso de la energía renovable en el país.

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica surge como alternativa para impulsar el desarrollo de tecnologías de energía renovable en México. Es un biocombustible que utiliza materias primas que no compiten con alimentos para consumo humano, además de lograr mejores indicadores ambientales en comparación a combustibles fósiles y biocombustibles de primera generación (a partir de maíz y caña de azúcar).

La biomasa lignocelulósica está constituida por extraíbles como ceras y lípidos; carbohidratos como almidón, celulosa y hemicelulosa, lignina y minerales (Dien y Bothast, 2009). Los procesos de conversión lignocelulósicos permiten un uso completo del material, el cual se encuentra en diversas fuentes: cáscaras de semilla, tallos de residuos, hierbas de rápido crecimiento y árboles (Doornbosch y Steenblick, 2007); lo anterior, en contraste con etanol de primera generación, que se obtiene a partir de la fracción de azúcar o almidón de la planta (un pequeño porcentaje de la masa total).

En la presente tesis, se analizó la biomasa lignocelulósica de pasto Toledo (*Brachiaria brizantha*; Sin. *Urochloa brizantha*; CIAT 26110) como materia prima para la producción de bioetanol.

1.1 Antecedentes

Actualmente, en el mundo se consumen cerca de 400 EJ (exajoules) de energía al año y genera aproximadamente, una cantidad equivalente a 100 EJ de residuos de cultivos, en su mayor parte inutilizados. Se podrían producir unos 180 EJ adicionales a partir de pastos, árboles y otras especies alternativas de rápido crecimiento. Hipotéticamente, si la demanda potencial de etanol se tradujera en hectáreas de caña de azúcar o maíz, las dos principales materias primas para etanol, se necesitaría plantar 300 millones de hectáreas de caña o 590 millones de hectáreas de maíz; aproximadamente, 15 y cinco veces más de la superficie dedicada a estos cultivos actualmente, a nivel mundial. Por lo tanto, la bioenergía no debe considerarse como el único sustituto del petróleo, sino como alternativa entre las fuentes de energía renovables (De la Torre, 2006).

Las crisis del petróleo de los años setenta, impulsó el interés en los biocombustibles como alternativa a los combustibles fósiles, para su uso en el transporte en muchos países. Brasil aceleró su programa de etanol nacional (Proálcool) después de que los precios del petróleo alcanzaron su punto máximo en 1979; Estados Unidos (EE.UU.), puso en marcha un programa de etanol a partir de maíz casi al mismo tiempo, pero a escala más pequeña (Worldwatch, 2007).

El uso de bioetanol de segunda generación aumentará a medida que surjan tecnologías que permitan una conversión eficiente de biomasa rica en celulosa, en combustibles para el transporte y electricidad. Los avances tecnológicos no sólo ayudarán a que la bioenergía compita con los combustibles fósiles económicamente, también ampliará la gama de materias primas, algunas de las cuales (pastos y árboles de crecimiento rápido) pueden desarrollarse en regiones marginales, menos fértiles y propensas a la sequía (Hazell y Pachauri, 2006).

La producción mundial de etanol combustible creció de 30,800 millones de litros en 2004, hasta 76,000 millones de litros en 2009, a una tasa anual promedio del 20%. Los dos principales productores, los EE.UU. y Brasil, representaron alrededor del 88% del total, en 2009 (REN21, 2005; REN21, 2009). En 2006, los EE.UU. superaron a Brasil,

para convertirse en el principal productor de etanol combustible en el mundo, mediante la producción de más de 18,000 millones de litros (REN21, 2007).

La producción de etanol a partir de maíz impactó negativamente la economía del proceso, produciendo etanol más caro, en comparación a combustibles fósiles; por lo cual, la producción de bioetanol se ha desplazado hacia la utilización de materiales lignocelulósicos, con la finalidad de reducir costos de producción y utilizar materias primas que no sean de consumo humano.

En la Ciudad de México, diariamente, cuatro millones de vehículos consumen aproximadamente 17.2 millones de litros de gasolina (González-César, 2002). El etanol se utiliza ya sea como materia prima química o como un promotor de octano o aditivo de gasolinas. En años recientes se han elaborado mezclas de etanol/gasolina en proporciones de 8%:92%, con el propósito de reducir la contaminación. Teniendo en consideración este aspecto y el hecho de que anualmente las destilerías en nuestro país producen 53 millones de litros de etanol; si se destinara esa cantidad de etanol para elaborar combustible en las proporciones mencionadas, solamente existiría abasto para cinco semanas en la Ciudad de México (Hernández-Salas *et al.*, 2009).

En febrero de 2008, se publicó la Ley de Promoción y Desarrollo de Bioenergéticos, donde PEMEX proyecta la posibilidad de utilizar etanol anhidro como oxigenante en gasolinas. El oxígeno presente en la gasolina garantiza mejor combustión, quemando todo el contenido energético de ésta, de manera que las emisiones hacia la atmósfera se reducen considerablemente. Debido a los problemas derivados del uso del éter metil tert-butílico (MTBE) como oxigenante, PEMEX aumenta sus investigaciones sobre la utilización de etanol como el principal oxigenante de la gasolina (SENER, 2008).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar química y energéticamente la biomasa lignocelulósica de pasto Toledo (*Brachiaria brizantha*; Sin. *Urochloa brizantha*; CIAT 26110) a distintas frecuencias de corte, para determinar su potencial como materia prima para producir bioetanol.

1.2.2 Objetivos particulares

1. Cuantificar el contenido de extractos, lignina, nitrógeno, holocelulosa, hemicelulosa y celulosa, de pasto Toledo, a distintas frecuencias de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del corte).
2. Determinar carbono fijo, cenizas, materia volátil y poder calorífico de pasto Toledo, a distintas frecuencias de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del corte).
3. Estimar el rendimiento teórico de bioetanol del pasto Toledo, a distintas frecuencias de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del corte).

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características de Pasto Toledo (*Brachiaria brizantha*; Sin. *Urochloa brizantha*; CIAT 26110)

2.1.1 Aspectos generales

El género *Brachiaria* posee alrededor de 100 especies originarias de África, Asia, Australia y América. En los países tropicales de América el número de especies de mayor uso se reduce a siete: *Brachiaria arrecta*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. mutica*, *B. ruziziensis* y *B. brizantha*. El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) posee una colección de *Brachiaria*, en su mayoría de *B. brizantha*, que comprende cerca de 700 accesiones de 27 especies identificadas, ésto demuestra la importancia forrajera que tiene esta especie. La mayor parte de esta colección proviene de Australia, Estados Unidos y Kenia (Miles *et al.*, 1998).

Toledo es una gramínea forrajera derivada directamente de *Brachiaria brizantha* CIAT 26110; la cual, fue recolectada en 1985 en Burundi, África. En septiembre de ese mismo año, dicha accesión fue registrada en el Banco de Germoplasma en el CIAT con el número 26110. Es una gramínea perenne, erecta y de fotosíntesis C₄. Crece formando macollos, produce tallos vigorosos capaces de enraizar a partir de los nudos cuando éstos entran en contacto con el suelo y puede alcanzar hasta 1.60 metros de altura. Las hojas son lanceoladas con poca pubescencia, alcanzan hasta 60cm de longitud y 2.5cm de ancho (Lascano *et al.*, 2002).

2.1.2 Adaptación y rendimiento de forraje

Toledo tiene amplio rango de adaptación a climas y suelos. Crece bien en condiciones de trópico subhúmedo, con períodos secos entre cinco y seis meses y promedios de lluvia anual de 1600 mm y, en trópico muy húmedo, con precipitaciones anuales superiores a 3500 mm. Se desarrolla bien en suelos ácidos de baja fertilidad; sin embargo, su mejor desempeño se ha observado en localidades con suelos de mediana a buena fertilidad. Tolera suelos arenosos y persiste en suelos mal drenados (Casasola, 1998). Crece bien durante la época seca, manteniendo mayor proporción de hojas verdes, en comparación a otros cultivares de la misma especie, como *B. brizantha* (Marandú y Libertad); lo cual, parece estar asociado con alto contenido de carbohidratos no-estructurales (197mg kg⁻¹ MS) y poca cantidad de minerales (8 %) en el tejido foliar. En diferentes sitios de Colombia, con fertilidad y clima contrastantes, los promedios de producción de materia seca de pasto Toledo variaron entre 25.2 y 33.2 t ha⁻¹ por año, realizando cortes cada ocho semanas (Lascano, 2002).

2.2 Biomasa Lignocelulósica: Composición y Estructura

2.2.1 Biomasa Lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es la más abundante en la tierra (Kim *et al.*, 2002), incluye a residuos forestales; residuos agrícolas como bagazo de caña de azúcar, olote y rastrojo de maíz, paja de trigo y arroz; residuos industriales, tales como pulpa y del procesamiento del papel; residuos sólidos urbanos, y cultivos energéticos, como pasto varilla (*Panicum virgatum*; Mielenz, 2001; Knauf y Moniruzzaman, 2004). Se compone

principalmente de tres tipos diferentes de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, entrelazados en una compleja estructura molecular. Su composición principal comprende celulosa (20-50 %), hemicelulosa (20-35 %), lignina (10-35 %), además de otros componentes (Fengel y Wegener, 1984; Badger, 2002; Mielenz, 2001; Knauf y Moniruzzaman, 2004). La composición y porcentajes de polímeros varían entre especies vegetales, edad y etapa de crecimiento (Jeffries, 1994).

Las propiedades de las fibras lignocelulósicas, morfología y funcionalidad de la pared celular, son resultado del alto grado de organización, estructuración y coordinación de estos polímeros. Una parte minoritaria de los materiales lignocelulósicos consiste en compuestos de bajo peso molecular, solubles en agua o en solventes orgánicos, así como pequeños contenidos de proteínas y sales minerales (Fengel y Wegener, 1984; Sjöström, 1981). Si se comparan con la madera, las plantas herbáceas o no leñosas, generalmente tienen menor contenido en lignina, mayor sílice y cenizas; mientras que, el contenido en celulosa es equivalente (Cuadro 1; Atchison y McGovern, 1983).

Cuadro 1. Composición química de biomásas lignocelulósicas.

Composición de la biomasa (%)					
Fuente	Celulosa	Lignina	Hemicelulosa	Cenizas	Referencia
<i>Pennisetum purpureum</i> (perenne)	36	7	28	-	Van Soest, 1994.
<i>Brachiaria humidicola</i> (perenne)	37.7	10.4	37	-	Arias y Hernández, 2002.
<i>Miscanthus giganteus</i> (perenne)	37-45	17-21	19-25	1-3	Haffner <i>et al.</i> , 2013.
Pino (madera de conífera)	25-42	18-26	21-30	0.3-2	www.nrel.gov/biomass
Álamo (madera de latifoliada)	44-55	18-25	24-40	1-4	www.nrel.gov/biomass
<i>Agave tequilana</i>	31-55	7-12	8-17	3-7	www.nrel.gov/biomass

2.2.2 Celulosa

Componente principal de la pared celular vegetal y la macromolécula más abundante de la tierra (Brown, 2003). Es un homopolímero lineal formado por monómeros de glucosa, unidos mediante enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$. Polisacárido de alto peso molecular que puede presentar polimerización de hasta 15,000 monómeros, dependiendo del origen y una longitud de 4-7 micras (Sjöström, 1981). La unidad estructural de la celulosa es la celobiosa, compuesta por dos unidades de D-glucopiranosas unidas mediante un enlace O-glucosídico $\beta(1\rightarrow4)$.

En la celulosa, las cadenas de glucosa están fuertemente unidas entre sí, formando agregaciones fibrilares estabilizadas lateralmente por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, entre grupos hidroxilo de moléculas adyacentes. Esta gran red de enlaces de hidrógeno, es la razón fundamental de la resistencia de la celulosa. Al asociarse las cadenas de celulosa de forma paralela, le confieren una determinada cristalinidad (Cowling y Kirk, 1976).

Las fibrillas se empaquetan entre sí, formando unidades mayores denominadas microfibrillas, que a su vez dan lugar a las fibras que constituyen la estructura cristalina de la celulosa. Las microfibrillas se pueden depositar en estructuras cristalinas altamente densas. Se cree que la densidad de las microfibrillas está regulada por la abundancia de dos fases cristalinas, α y β , que difieren por la forma de empaquetamiento (Ding y Himmel, 2006; Somerville *et al.*, 2004).

La celulosa de la biomasa lignocelulósica se clasifica en cristalina y paracristalina (amorfa). Las regiones en las que la celulosa presenta una estructura ordenada se denominan cristalinas y, aquellas cuya estructura es menos ordenada, se denominan amorfas. La cristalinidad protege a la celulosa contra la degradación (hidrólisis de los enlaces β -1,4 entre las unidades). La abundancia de las zonas amorfas hace más susceptible la celulosa a la hidrólisis. En la pared secundaria de fibras lignificadas, parte de la celulosa se encuentra altamente orientada, para dar estructura a células del

sistema vascular. Sin embargo, en la pared secundaria de muchas plantas herbáceas, parte de la celulosa no forma fibrillas sino laminillas cristalinas, como en la paja de trigo (Yu *et al.*, 2005).

La celulosa puede ser hidrolíticamente descompuesta en glucosa, ya sea por enzimas celulolíticas o químicamente, por ácido sulfúrico u otros ácidos (Aristidou y Penttila, 2000; Sues *et al.*, 2005). En maderas, la celulosa representa cerca de 50 % del material lignocelulósico seco (Aitken *et al.*, 1988); mientras que, en materiales lignocelulósicos herbáceos o no leñosos, el contenido presenta mayor variación, del 20 al 50 % (Knauf y Moniruzzaman, 2004).

2.2.3 Hemicelulosa

La estructura de la hemicelulosa presenta, en comparación con la celulosa, enormes variaciones en cuanto a composición y disposición entre distintos tipos de biomasa (Puls, 1997). La función principal es su interacción con celulosa y lignina para proporcionar rigidez a la pared celular (Sun *et al.*, 1998). Las cadenas de hemicelulosas se asocian con microfibrillas de celulosa, por medio de puentes de hidrógeno (Scheller y Ulvskov, 2010). Se conocen diferentes tipos de hemicelulosas en plantas: xilanas, mananas, glucanas, galactanas y galacturanas. Las xilanas y mananas forman los grupos de hemicelulosas más importantes presentes en materiales lignocelulósicos (Wilkie, 1979).

Las hemicelulosas son polímeros ramificados compuestos de pentosas y hexosas, pueden ser hidrolizadas por hemicelulasas o ácidos, para liberar azúcares componentes, incluyendo xilosa, arabinosa, galactosa, glucosa y manosa. Las hexosas, tales como glucosa, galactosa y manosa, son fermentadas a etanol fácilmente por muchos organismos; sin embargo, las pentosas incluyendo xilosa y arabinosa, se fermentan a etanol por medio de cepas de levaduras y bacterias y, por lo general, resultan en rendimientos relativamente bajos. La xilosa comprende generalmente del 15-30 % de la biomasa lignocelulósica de maderas latifoliadas, residuos agrícolas y pastos, al ser fermentada, se aumenta la eficiencia en el proceso de obtención de etanol (Aristidou y Penttila, 2000; Sues *et al.*, 2005).

Las hemicelulosas y en particular los xilanos, pueden ser solubilizados de manera eficiente por hidrólisis en ácido débil (Wilkie, 1979). La extracción de azúcares de las hemicelulosas la han convertido en fuente de alimento animal y productos químicos (Thompson, 1983; Overend y Chornet, 1987). No obstante, las cadenas laterales de los xilanos incluyen compuestos fenólicos de ácido ferúlico y ácido p-cumárico, que pueden formar reticulaciones covalentes entre sí o con lignina (Scheller y Ulvskov, 2010), lo cual hace difícil su fermentación a etanol.

Caracterizar los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica es útil para elegir cepas fermentativas, acorde al perfil de carbohidratos y lograr mayor eficiencia de utilización de los azúcares disponibles (Cuadro 2).

Cuadro 2. Caracterización de azúcares en pastos.

	Arabinosa (%)	Galactosa (%)	Glucosa (%)	Xilosa (%)	Referencia
<i>Pennisetum glaucum x P. purpureum</i>	2.5	0.77	33.8	22.4	Mateus <i>et al.</i> , 2012.
<i>Panicum virgatum</i>	3.2	1.1	34.3	20.9	Agblevor <i>et al.</i> , 1994.
<i>Panicum virgatum</i>	3.6	2.1	34.8	23.4	Thammasouk <i>et al.</i> , 1997.
<i>Festuca</i> spp.	3.0	1.1	39.8	23.2	Thammasouk <i>et al.</i> , 1997.

2.2.4 Lignina

La principal característica de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad, resistencia a ataques microbianos y al estrés oxidativo. La lignina se encuentra principalmente en la lámina media de la pared celular y en las capas de la pared celular secundaria. Este polímero es insoluble en agua y ópticamente inactivo; por lo cual, su degradación es complicada (Fengel y Wegener, 1984) y puede alcanzar

hasta 30 % en peso seco, de las paredes celulares secundarias (Scheller y Ulvskov, 2010). Su hidrofobicidad, junto con el nivel de entrecruzamiento con los polisacáridos, es importante para la permeabilidad de poros entre células vegetales. Se encuentra principalmente en xilema. Es importante en el sistema de defensa de la planta frente a patógenos y protege a los polisacáridos de la pared celular, frente a una despolimerización (Sarkanen y Ludwig, 1971; Hüchelhoven, 2007).

En general, las ligninas son copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropano monoméricas (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Gellerstedt y Henrinksson, 2008). Los tres principales monolignoles se forman en el citoplasma a través de la ruta del ácido shikimato, que produce fenilalanina como intermediario. Los monolignoles se generan mediante reacciones de desaminación, hidroxilación, reducción y metilación, catalizadas por diversas enzimas. Estos monolignoles reaccionan en la pared celular, a través de reacciones de oxidación, catalizadas por peroxidasas (radicales intermediarios) para formar finalmente polímeros de lignina. La composición química consiste principalmente en tres tipos de unidades repetitivas: cumaril (H), guaiacil (G) y siringil (S).

La lignina se clasifica por sus unidades repetitivas constituyentes: lignina de gimnosperma o coníferas (guaiacil), angiosperma o frondosas (guaiacil y siringil) y herbáceas (guaiacil, siringil y cumaril), en proporciones variables (Lapierre *et al.*, 1995; Billa *et al.*, 1998). Las ligninas ricas en residuos de guaiacil, se encuentran en gimnospermas (maderas de coníferas). Las maderas de latifoliadas contienen tanto grupos guaiacílicos como siringílicos en una relación que puede variar de 4:1 a 1:2. El último y posiblemente más complejo grupo de ligninas, son las de herbáceas, ya que contienen los tres residuos aromáticos en cantidades significativas (Nimz *et al.*, 1981).

Las ligninas de plantas anuales son muy diferentes de las de maderas, ya que poseen ácidos fenólicos (PAC), ácidos p-coumárico, ferúlico y aminoácidos, estrechamente asociados con el núcleo de la matriz de lignina. La presencia de PAC en ligninas de pajas y plantas anuales, tiene importantes consecuencias en la eficiencia de

tratamientos químicos utilizados para incrementar la utilización de estos materiales (Van Soest, 1982).

Las proporciones relativas con que se incorporan los monolignoles durante la lignificación pueden alterarse en los estadios de la vida de una planta y la estructura de la lignina depende del tipo de tejido en que se encuentra. Por ejemplo, la lignina del xilema tiene unidades S y G y <1 % de unidades H. Además de las subunidades principales que forman la estructura de la lignina, existen otros intermediarios cinamílicos minoritarios como ácido ferúlico, diferúlico o p-cumárico, que posibilitan la asociación hemicelulosa-lignina, mediante enlaces con sustituyentes monoméricos como arabinosa o ácido glucurónico (Lam *et al.*, 2001).

Los enlaces éter (C-O) y alquílicos (C-C) presentes en la lignina no son susceptibles de ataques hidrolíticos y, por tanto, la lignina es altamente resistente a la degradación. La inserción de filamentos de celulosa en la lignina proporciona una barrera física a la degradación para la lignocelulosa, esto representa un obstáculo para la producción de biocombustibles de segunda generación. Los métodos actuales para la producción de bioetanol a partir de celulosa, utilizan una etapa de pre-tratamiento físico altamente demandante de energía, tal como explosión de vapor, para liberar la celulosa y su posterior conversión a monómeros de glucosa. Para lograr la deslignificación de cualquier material lignocelulósico, los enlaces éter entre los precursores de lignina tienen que ser rotos por tratamientos con agentes oxidantes o tratamientos con agentes químicos y altas temperaturas (Wayman y Chua, 1979).

La lignina no puede ser fermentada a etanol, así como los extractivos y otros componentes presentes. Su presencia tiene efecto negativo en procesos fermentativos, por lo que cualquier proceso viable de obtención de etanol, a partir de biomasa lignocelulósica, tiene que incluir su extracción y aprovechamiento en la obtención de productos de valor y/o generación de energía. La lignina se puede emplear en la extracción de una gran variedad de productos de alto valor añadido o como fuente de energía que pudiera cubrir, total o parcialmente, las demandas energéticas de una planta productora de etanol a partir de biomasa (Wilson, 2008).

2.2.4.1 Complejos Lignina-Carbohidratos

La celulosa y hemicelulosa constituyen aproximadamente 70 % de la biomasa lignocelulósica y están estrechamente vinculados al componente de lignina, a través de enlaces hidrofílicos y covalentes, Ésto hace que sea resistente a cualquier tratamiento (Knauf y Moniruzzaman, 2004). Las hemicelulosas están asociadas a la lignina a través de unidades de arabinosa, xilosa y galactosa, por enlaces de tipo glicosídico, éter bencílico y éster bencílico, formando complejos (Watanabe, 2003).

El entrecruzamiento de los carbohidratos con lignina hace que no se puedan tratar las fibras lignocelulósicas como fracciones separadas de celulosa, hemicelulosa y lignina. Estas fracciones se encuentran en complejos presentes en la pared primaria y secundaria (Ishii, 1997). Parte de la lignina está presente en complejos con carbohidratos denominados LCC (lignin-carbohydrate complexes). Para fraccionar estos complejos se usan técnicas específicas, dependiendo de la estructura de la lignina, parte anatómica y la madurez de la planta (Himmelsbach, 1993).

Los complejos LCC son diferentes entre herbáceas y leñosas. Aparte del contenido de unidades cumaril (H), la lignina de herbáceas se caracteriza por el nivel de acilación de la lignina de forma natural y por la posición de las cadenas laterales de unidades siringil (S; Crestini y Argyropoulos, 1997; Ralph y Lu, 1999; Del Río *et al.*, 2008); así como también, por su contenido de ácido ferúlico y ácido p-cumárico, que forman puentes carbohidrato-carbohidrato y lignina-carbohidratos (Buranov y Mazza, 2008). Los enlaces de estos puentes con lignina y carbohidratos (sobre todo arabinoxilanos) consisten en ésteres y éteres (Himmelsbach, 1993; Lapierre y Monties, 1989) que se pueden cuantificar por fraccionamiento en medio alcalino o metilación, respectivamente (Wallace *et al.*, 1995). Higuchi *et al.* (1967), estimó que entre el 3 y 10 % de la lignina de especies herbáceas está compuesta por ácido p-cumárico, unido por enlaces de ésteres.

2.2.5 Extractivos

La principal clasificación incluye monosacáridos, polisacáridos, aceites volátiles, terpenos, ácidos grasos (y sus ésteres), ceras, alcoholes polihidroxiados, alcaloides, y compuestos aromáticos (Goldstein, 1991). Fengel y Wegener (1984), mencionaron que los extractivos se clasifican según su solubilidad, en compuestos lipofílicos (lípidos y derivados) y compuestos hidrofílicos (hidrosolubles).

Los compuestos extractivos actúan como intermediarios metabólicos, sustancias de reserva de energía o forman parte de mecanismos de defensa contra ataques microbianos. Asimismo, son responsables del color, olor y resistencia al marchitamiento de las plantas (Sjöström, 1981). Los extractivos representan entre 4 y 10 % del peso total de la biomasa lignocelulósica (Rowe, 1989).

La cantidad de extractivos depende de las características del tejido y el ambiente; por ejemplo, en hojas, órganos donde se realiza la fotosíntesis, síntesis química y almacenamiento de hidratos de carbono, tiende a ser más alta la concentración de extractivos, tanto en el follaje de biomasa herbácea como de la leñosa (Hakkila, 1989).

2.2.6 Proteína

La proteína no es un componente principal de cultivos energéticos lignocelulósicos, la mayoría de las tecnologías de biorefinería que se centran en la conversión de lignocelulosa, no extraen las proteínas de la biomasa. En cuanto al uso de tecnologías termoquímicas, el nitrógeno es volátil y se pierde durante la fase gaseosa (Hayes, 2011).

Investigaciones recientes han demostrado que uno de los principales impactos ambientales de los biocombustibles sólidos es la combustión causada por las emisiones de Óxidos de nitrógeno-NO_x (Nussbaumer, 2003). Así, las emisiones de NO_x aumentan con mayores contenidos de nitrógeno en el combustible (Leckner y Karlsson, 1993).

2.2.7 Pectinas

Las pectinas son características de las paredes celulares (pared primaria y lámina

media) de dicotiledóneas, especialmente en frutos. En otro tipo de materiales, como maderas o plantas herbáceas, son componentes minoritarios. Presentan estructuras y propiedades físico-químicas altamente diversas y la caracterización por su solubilidad (extracción) no es lo más apropiado (Scheller y Uvlskov, 2010).

Su función está relacionada con la porosidad de la pared celular, regulación de pH y balance iónico. Estructuralmente, las pectinas están formadas por ácido galacturónico y menores proporciones de ramnosa, arabinosa y galactosa. Se distinguen dos grupos principales: ácido poligalacturónico y ramnogalacturonanos. El ácido poligalacturónico es un homopolisacárido formado por unidades de ácido galacturónico. Los ramnogalacturonanos son heteropolímeros más complejos formados por cadenas de ácido galacturónico con ramificaciones de ramnosa, arabinosa y galactosa (Brett y Waldron, 1996; Carpita y Gibeaut, 1993).

2.2.8 Análisis inmediato

Evalúa la calidad de la biomasa sólida en términos porcentuales de contenido de humedad, material volátil, cenizas y carbón fijo (Kretschmann *et al.*, 2007).

El conocimiento de la composición y especificación de los elementos inorgánicos en los combustibles es de vital importancia para el estudio de temas relacionados con la combustión, como la ceniza y formación de depósitos, así como la retención de azufre y cloro en las cenizas (Nordin, 1994).

2.2.8.1 Humedad

El agua se encuentra principalmente de dos maneras: ya sea como líquido libre de vapor contenido en las cavidades celulares o como molécula unida dentro de las paredes celulares. El contenido de humedad de la biomasa es importante para la eficiencia de combustión de ésta, pero menos importante en tecnologías de fraccionamiento de lignocelulosa. El contenido de humedad de la biomasa es la relación de masa de agua contenida por unidad de materia seca. Para la mayoría de los procesos de conversión energética es imprescindible que la biomasa tenga un contenido de humedad inferior a 30 % (Valverde *et al.*, 2007).

2.2.8.2 Cenizas

Son sustancias que se pueden determinar por incineración del material entre 575 y 850°C. El contenido de ceniza puede variar mucho entre especies vegetales y es generalmente, más alta en residuos agrícolas. La ceniza presente en las plantas dependerá de su etapa de crecimiento, época del año y ubicación. La lixiviación de la biomasa almacenada puede reducir el nivel de compuestos inorgánicos en algunos casos (Wiselogel *et al.*, 1996).

En maderas tropicales, predominan sales inorgánicas de calcio, potasio, magnesio y sílice y se forman carbonatos, fosfatos, oxalatos y silicatos (Fengel y Wegener, 1984). Otros elementos tales como Mn, Na y P están presentes en cantidades menores. Los componentes traza, tales como Al, Fe, Zn, Cu, Ti, Pb, Ni, V, Co, Ag y Mo, también se encuentran en la mayoría de los sustratos (Pohlandt *et al.*, 1993; Naidenov *et al.*, 1982). Los aniones que suelen estar presentes, son cloruro, carbonato, sulfato y silicato (Osman y Goss, 1983).

Factores como especie y variedad; tipo de suelo y ubicación; prácticas de fertilización, y hora de cosecha, afectan la concentración de cenizas en los pastos. Por ejemplo, los niveles de sílice son más bajos en el tallo de gramíneas y más alta en inflorescencias, hojas y vainas de las hojas (Samson y Mehdi, 1998).

Alto contenido de cenizas pueden causar problemas en las reacciones de pirólisis y en los regímenes de combustión de la biomasa o carbón residual (Wiselogel *et al.*, 1996). El conocimiento de la concentración de cenizas es necesario para mejorar la eficiencia de operación y reducir costos asociados con el exceso de producción de escoria, durante el proceso de combustión (Subero, 2010).

2.2.8.3 Materia volátil

Son desprendimientos gaseosos de la materia orgánica e inorgánica durante el calentamiento. Son las combinaciones de carbono, hidrógeno, oxígeno y otros gases que contiene el combustible. El desprendimiento de volátiles es un proceso exotérmico (desprende calor) que ayuda al proceso de combustión de biomasa (Valverde *et al.*,

2007). En una muestra de masa conocida, la muestra es calentada a 900°C, fuera del contacto con el aire, durante 7 minutos; a medida que la masa se calienta, se desprenden productos gaseosos y líquidos. Existen desprendimientos a bajas temperaturas, pero aumentan a partir de 550°C; siendo constituyentes gaseosos principalmente agua, hidrógeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano y otros (Subero, 2010). Generalmente, un calentamiento rápido aumenta el porcentaje de materia volátil, por este motivo está normalizada la metodología (Ramírez, 1992). Los volátiles tienen un papel importante durante la ignición en las etapas iniciales de la combustión de la biomasa (Valverde *et al.*, 2007).

2.2.8.4 Carbono fijo

Es la parte no volátil y se quema en estado sólido. Es la diferencia entre la suma de la humedad residual, cenizas y materia volátil. El contenido en carbono fijo es un parámetro indicativo de la calidad del combustible (Subero, 2010).

2.3 Poder calorífico

El poder calorífico por unidad de masa es el parámetro que determina la energía disponible en la biomasa (Cerquera y Galindo, 2006). Otros autores lo definen como la medida de calor liberado por la combustión completa y total de la unidad de peso de dicho cuerpo (Covacevich, 1979).

El poder calorífico superior (PCS), es independiente del contenido de humedad y depende de la composición química del material. Existe una relación lineal entre calor de combustión y contenido de carbono del sustrato; por su parte, el oxígeno, nitrógeno y elementos inorgánicos tienden a reducir el calor de combustión. El poder calorífico inferior (PCI), es tal vez más relevante que el PCS en operaciones prácticas debido a que se considera la energía requerida para vaporizar el agua generada, cuando el hidrógeno y oxígeno de la biomasa se combinan. El contenido de hidrógeno se convierte entonces en un factor de reducción en el valor de calentamiento (Hakkila, 1989).

El poder calorífico se determina en la bomba calorimétrica y por ello, es una medición

directa del calor generado por la combustión completa de masa. Este análisis da una medida del poder calorífico superior (PCS) porque todo el calor generado lo recibe el calorímetro, ya que el vapor de agua que resulta se condensa, entregando su energía de evaporación (Hakkila, 1989).

El poder calórico está relacionado directamente con el contenido de humedad de la biomasa. Un elevado porcentaje de humedad en la biomasa reduce la eficiencia en la combustión, debido a que gran parte del calor liberado se usa para evaporar el agua y no se aprovecha en la reducción química del material (Hakkila, 1989).

2.4 Bioetanol

Se refiere al etanol producido a partir de biomasa como materia prima en la forma de azúcares fermentables y corresponde a un hidrocarburo de fórmula C_2H_5OH , incoloro e inflamable. La producción de bioetanol perdió importancia a finales de la primera mitad del siglo XX, al ser sustituida por la producción de etanol a partir de derivados del petróleo, siendo más barato. La elevación de los precios del petróleo causó que la producción vía fermentativa de etanol sea nuevamente retomada. El bioetanol es renovable y, al quemarlo, el bióxido de carbono que libera retorna a las plantas, para ser utilizado en la fotosíntesis y producir nuevamente biomasa.

2.4.1 Usos

Entre los principales usos del etanol está la preparación de carburantes para vehículos automotores. La mezcla de gasolina y etanol es llamada comúnmente “gasohol”, la cual puede utilizarse en motores de combustión interna sin modificar, hasta 15 %, volumen de etanol (E10). La mezcla E10, está establecida como la cantidad máxima de etanol permitida para motores no modificados, básicamente por las garantías de los fabricantes de automóviles (Yacobucci, 2010). El bioetanol se puede mezclar con gasolina sin plomo de 10 a 25 %, sin dificultad. En ciertos motores, se ha logrado incorporar hasta en 100 % (Verdesio, 2003).

El bioetanol permite un aumento del índice de octano y, por tanto, reducción del consumo y contaminación (10 a 15 % menos de monóxido de carbono e hidrocarburos).

El uso de bioetanol como potenciador de combustibles fósiles mejora la oxidación de la gasolina, por lo cual, reduce las emisiones de gases de efecto invernadero, alrededor de 12 % (Chandel y Singh, 2011).

El etanol tiene menor poder calorífico que la gasolina; un automóvil suministrado con etanol, recorrerá alrededor de 80 % de los kilómetros, comparado con uno suministrado con un mismo volumen de gasolina tradicional (Balat *et al.*, 2008).

En México, en 2008, se aprobó la ley de bioenergéticos; la cual, fomenta la utilización de bioetanol en la gasolina, con el fin de disminuir el uso de agentes oxigenantes como éter metil ter-butílico (MTBE); el cual, ha resultado dañino para el ecosistema. El bioetanol podría así, sustituir al MTBE, producto oxigenante con el que se reformulan las gasolinas en México desde 1989. Esta acción es muy importante pues el MTBE, por ser un compuesto muy estable, de baja degradación y muy soluble en agua, ha resultado ser un contaminante de aguas subterráneas (Nava y Morales, 2006).

2.5 Implicaciones ambientales

La biomasa es fuente renovable de energía; sin embargo, el proceso de producción requiere actualmente, el consumo de combustibles fósiles en cantidades que varían según el tipo de biomasa y proceso de producción. Cuando se eligen de manera adecuada los cultivos, acorde al ambiente y asociado a prácticas sostenibles en el proceso de producción, cosecha y distribución, nos aproximamos a balances favorables de carbono y energía, contribuyendo a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero.

Específicamente, los pastos de rápido crecimiento (mejor aún si son nativos), al ser cultivos perennes, requieren menos energía invertida en comparación a cultivos anuales, debido al menor uso de maquinaria e insumos (Sanderson *et al.*, 1999).

La constante extracción de nutrientes de los cultivos, contribuye a la erosión del suelo, pérdida de materia orgánica y degradación. Estos efectos se agudizan por labranza excesiva que causa disminución gradual de la productividad de los cultivos. Una alternativa es combinar prácticas de conservación, por ejemplo, retención de

niveles adecuados de residuos sobre la superficie del suelo y rotación de cultivos. Lo anterior, contribuirá a mejorar el balance de energía y mantenimiento de los niveles de fertilidad del suelo.

En el siguiente capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos al evaluar la biomasa de *Brachiaria brizantha* Sin. *Urochloa brizantha* CIAT 26110, con la finalidad de determinar su potencial para la producción de bioetanol en áreas tropicales.

2.6 LITERATURA CITADA

Aglevor, F.A., R.J. Evans, and K.D, Johnson. 1994. Molecular-beam mass spectrometric analysis of lignocellulosic material. I. Herbaceous biomass. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 30:125–144.

Aitken, I., F. Cadel, and C. Voillot. 1988. Fiber Constituents Paper Pulp and Paperboard Practice of Analysis. 1st edition. Practice of Analysis, Centre Technique du Papier, Grenoble. pp: 85-92.

Arias A. y H. Hernández. 2002. Composición química del pasto aguja (*Brachiaria humidicola*) sometida a pastoreo en una finca del municipio Guanare, estado Portuguesa. *Revista Científica (Venezuela)*. 12: 562-565.

Aristidou, A. and M. Penttila. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*. 11: 187-198.

Atchison, J.E. and J.N. McGovern. 1983. History of paper and the importance of non-wood plant fibers. *In*: Hamilton F., Leopold B., Tech (eds.) Secondary fibers and non-wood pulping. Pulp and Paper Manufacture. 3rd Ed. Joint Textbook Committee of the Paper Industry. Atlanta, GA. pp: 1-3.

Badger, P.C. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. *In*: J. Janick, A. Whipkey (eds.). Trends in New Crops and New Uses, Vol. 1. ASHS Press, Alexandria, VA. pp: 17–21.

Balat, M., Balat, H., and Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 551-573.

Billa, E., E.G. Koukios, and B. Monties. 1998. Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods. *Polymer Degradation and Stability* 59: 71-75.

Brett, C.T. and K.W. Waldron. 1996. The molecular component of the cell wall and cell wall architecture and the skeletal role of the cell wall. *In: Black, M., Charlwood, B. (eds.) Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls.* Chapman & Hall, 2ndEd. London, UK. pp: 4-74.

Brown, R.M. 2003. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. 42: 487-495.

Bungay, H. R. 1981. *Energy, the Biomass Options*, New York, NY, John Wiley and Sons. pp: 88-99.

Buranov A.U. and G. Mazza. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*. 28: 237-259.

Carpita, N.C. and D.M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 3: 1-30.

Casasola, F.R. 1998. Efecto de la humedad del suelo sobre la anatomía y morfología de cuatro introducciones de *Brachiaria* spp. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Costa Rica sede del Atlántico. Costa Rica. 63p.

Chandel, A.K. and O.V. Singh. 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of "Biofuel". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89: 1289-1303.

Cerquera, D. y O. Galindo. 2006. Estudio de la eficiencia energética del proceso de secado de arroz del Molino Roa S.A. Tesis de grado Ingeniero Mecánico. Universidad

de Ibagué. Colombia. 43 p.

Covacevich, R. 1979. Poder Calorífico de Pino Insigne (*Pinus radiata* D. Don) y de otras especies forestales chilenas. Tesis de grado Ingeniero Forestal. Universidad de Chile. Chile. 85 p.

Cowling E.B. and T.K. Kirk. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnology and Bioengineering*. 6: 95-123.

Crestini C. and D.S. Argyropoulos. 1997. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative ³¹P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α-O-4 substructures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 1212-1219.

Del Río J.C., J. Rencoret., G. Marques., A. Gutiérrez., D. Ibarra., Santos., J.I. Jiménez-Barbero., L. Zhang., and A.T. Martínez. 2008. Highly acylated (acetylated and/or p-coumaroylated) native lignins from diverse herbaceous plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56: 9525-9534.

De la Torre, D.G. 2006. Desarrollo de bioenergía: Asuntos económicos y sociales. *Bioenergía y agricultura: Promesas y retos*. Instituto Internacional de Investigación sobre políticas Alimentarias. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (ed.). España. Informe Técnico. 13-16.

Dien B. and R. Bothast. 2009. A primer for lignocellulose biochemical conversion to fuel ethanol. *In: Industrially Robust Enzymes and Microorganisms For Production Of Sugars and Ethanol From Agricultural Biomass*. National Center for Agricultural Utilization Research. Nottingham, England. pp: 73-93.

Ding, S.Y. and M.E. Himmel. 2006. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 597-606.

Doornbosch R. and R. Steenblik. 2007. *Biofuels: is the cure worse than the disease?* OECD round table on sustainable development. Paris, Francia. Consultado el 10 de

diciembre de 2014. Disponible en: <http://www.oecd.org/sd-roundtable/39411732.pdf>.

Fengel, D. and G. Wegener. 1984. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. W. de Gruyter (ed.). 2nd Edition. Berlin. 613 p.

Gellerstedt, G. and Henriksson, G. 2008. Lignins: Major sources, structure and properties. In: M. Naceur Belgacem, & A. Gandini (eds.), Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier B.V. pp: 201-224.

Goldstein, I. S. 1991. Overview of the chemical composition of wood. In: Lewin, M., Goldstein, I. S. (eds.) Wood Structure and Composition, International Fiber Science and Technology Series. 2nd Edition. Marcel Decker, Inc. (ed.). New York. pp. 1–5.

González-César, R. 2002. Sustentabilidad de la producción e introducción de alcohol como carburante para uso en automotores en la Ciudad de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México. 36 p.

Haffner, F.B., V.D. Mitchell, R.A. Arundale, S. Bauer. 2013. Compositional analysis of *Miscanthus giganteus* by near infrared spectroscopy. Cellulose. 20: 1629–1637.

Hakkila, P. 1989. Utilization of Residual Forest Biomass. Berlin: Springer Series in Wood Science. Springer. Heidelberg. 2nd Edition. New York. 568p.

Hayes, J. D. 2011. Analysis of lignocellulosic feedstocks for biorefineries with a focus on the development of near infrared spectroscopy as a primary analytical tool. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Limerick. Ireland. pp: 30-55.

Hazell, P. and R.K. Pachauri. 2006. Bioenergía y agricultura: Promesas y retos. Información general. Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (ed.). España. Informe Técnico. 45 p.

Hernández-Salas, J. M., M. S. Villa-Ramírez, J. S. Veloz-Rendón, K. N. Rivera-Hernández., R. A. González-César., M. A. Plascencia-Espinoza and S. R. Trejo-

Estrada. 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresources Technology*. 100: 1238–1245.

Higuchi, T., Y. Ito and I. Kawamura. 1967. p-Hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine ammonia lyase in its formation. *Phytochemistry*. 6: 875-881.

Himmelsbach, D.S. 1993. Structure of forage cell walls (session synopsis). *In*: Jung H.G., Buxton D.R., Hartfield R.D., Ralph J. (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy Inc., Madison, WI. pp: 271-283.

Ishii, T. 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* 127: 111-127.

Jeffries, T. W. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *In*: *Biochemistry of microbial degradation*. Ratledge C. (ed) Kluwer. 1RA Edition. Netherlands. pp: 233–277.

Kim, K. H., M. P. Tucker and Q. A. Nguyen. 2002. Effects of pressing lignocellulosic biomass on sugar yield in two-stage dilute-acid hydrolysis process. *Biotechnology Progress*. 18(3): 489-494.

Knauf, M. and M. Moniruzzaman. 2004. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*. 106:147-150.

Kretschmann, D., J. Winandy., C. Clausen., M. Wiemann., R. Bergman., R. Rowell, J. Zerbe., J. Beecher., R. White., D. Mckeever, and J. Howard. 2007. *Wood*. Kirt-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th Edition. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NY. U.S.A. 890 p.

Lam, T.B.T., Kadoya, K., K. Liyama. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. *Phytochemistry*. 57: 987-992.

Lapierre, C., Pollet B., and C. Rolando. 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Research on Chemical Intermediates*. 21 (3-5): 397-412.

Lapierre, C. and B. Monties. 1989. Structural information as gained from the thioacidolysis of grass lignins and their relation with alkali solubility. *In: Wood and Pulping Chemistry 6. TAPPI Proceedings Annexe*. Atlanta, USA. 3-2. pp: 615-621.

Lascano, C., R. Pérez, C. Plazas, J. Medrano y P. J. Argel. 2002. Pasto Toledo (*Brachiaria brizantha* CIAT 26110) gramínea de crecimiento vigoroso para intensificar la ganadería colombiana. Informe Técnico. Vol 1. CORPOICA-CIAT, Colombia. 21 p.

Leckner, B. and M. Karlsson. 1993. Gaseous emissions from circulating fluidized bed combustion of wood. *Biomass and Bioenergy*. 7(5): 379–389.

Mateus, L., O. Hernández, M. Velásquez y J.J. Díaz. 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14: 146-156.

Mielenz, J.R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status, Review article. *Current Opinion in Microbiology*. 4(3): 324-329.

Miles, J., B. Mass y C. do Valle. 1998. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Cali, Colombia. CIAT. 312 p.

Naidenov, V. I., I.F. Koperin and V.R. Purin. 1982. Physical and chemical properties of the ash of waste wood. *Lesnoi Zhurnal*. 2: 115-117.

Nava, V. and M. Morales. 2007. Degradation of Metyl tert-Butyl Ether (MTBE) by Pseudomonas Strains. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 6(4): 339-352.

Nimz, H.H, D. Robert, O. Faix y M. Nemi, M. 1981. Carbon13 NMR spectra of lignins, 8. Structural differences between lignins of hardwoods, grasses and compression wood.

Holzforschung. 35: 16-26.

Nordin, A. 1994. Chemical elemental characteristics of biomass fuels. *Biomass and Bioenergy*. 6: 339–47.

Nussbaumer, T. 2003. Combustion and co-combustion of biomass: Fundamentals, technologies, and primary measures for emission reduction. *Energy and Fuels*. 17: 1510-1521.

Osman, E. A. and J. R. Goss. 1983. Ash chemical composition, deformation and fusion temperatures for wood and agricultural residues. *In: Symposium Proceedings of Winter Meeting of the American Society of Agricultural Engineers*. December. Chicago, IL, USA. pp: 11-33.

Overend, R.P. and E. Chornet. 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *In: Proceedings of the Royal Society on Technology in the 1990s: Utilization of Lignocellulosic Wastes*. London, England. 321: 523-536.

Pohlandt, K., M. Strecker, and R. Marutsky. 1993. Ash from the combustion of wood treated with inorganic wood preservatives. Element composition and leaching. *Chemosphere*. 26: 2121-2128.

Puls, J. 1997. Chemistry of Hemicelluloses: Relationship Between Hemicellulose Structure and Enzymes Required For Hydrolysis. *Macromolecular Symposia (eds)*. Volume 120. Germany. pp: 183-196.

Ralph, J. and F. Lu. 1999. The DFRC method for lignin analysis. 6. A simple modification for identifying natural acetates on lignins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 46: 4616-4619.

Ramírez, C.P.F. 1992. Introducción a la caracterización de carbones. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. Tesis de Maestría en Ciencias. pp: 33.

Renewable Energy Policy Network (Ren21). 2005. Renewables 2005 Global Status Report. Report Worldwatch Institute. Washington, DC. 27 p.

Renewable Energy Policy Network (Ren21). 2007. Renewables 2007 Global Status Report. Report Worldwatch Institute. Washington, DC. 44 p.

Renewable Energy Policy Network (Ren21). 2009. Renewables 2009 Global Status Report. Report Worldwatch Institute. Washington, DC. 27 p.

Rowe, J.W. 1989. Natural Products of Woody Plants. I and II. Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall. 1st Ed. Springer-Verlag, Berlin. pp: 250-273.

Samson, R. and B. Mehdi. 1998. Strategies to reduce the ash content in perennial grasses. *In*: Proceedings of bioenergy '98—expanding bioenergy partnerships, October 4–8, Madison, WI. Great Lakes Regional Biomass Energy Program, Chicago, IL. U.S.A. pp: 1124–31.

Sarkanen, K. V. and C. H. Ludwig. 1971. Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions. 1st Ed. Wiley-Interscience, New York. U.S.A. pp: 221-223.

Scheller, H.V. and P. Ulvskov. 2010. Hemicelluloses. Annual Review Plant Biology. 61: 263-289.

Secretaría de Energía (SENER). Programa de Introducción de Bioenergéticos 2008-2017. México D.F. Consultado el 21 de noviembre de 2014. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5101826

Sjöström, E. 1981. Wood chemistry: Fundamentals and Applications. 2nd edition. Academic Press San Diego, U.S.A. pp: 68-82.

Subero Pérez Elena. 2010. Caracterización de los Combustibles Sólidos. Proyecto de Tesis de Ingeniero Técnico Industrial. Universidad de Zaragoza, España. 12p.

Sues, A., R. Millati and L. Edebo. 2005. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research. 5: 669-676.

Sun, Y., and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol

production: A review. *Bioresource Technology*. 83: 1-11.

Sun, R.C., J.M. Fang, P. Rowlands, and J. Bolton. 1998. Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2804-2809.

Thammasouk, K., D. Tandjo, M.H. Penner. 1997. Influence of extractives on the analysis of herbaceous biomass. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 45: 437–443.

Thompson, N.S. 1983. Hemicellulose as a biomass resource. *In: Wood and Agricultural Residues. Research on Use For Feed, Fuels, and Chemicals*. J. Soltes (ed.) Academic Press. London. pp: 101-119.

Valverde, A.G., L. B. Sarria y Y. J. P. Monteagudo. 2007. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. *Scientia et Technica*. 13(37): 255-260.

Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminants*. O&B Books Inc. Corvallis, Oregon, U.S.A. 374 p.

Van Soest, P.J. 1994. *Ecology of the Ruminants*, 2nd Ed., Cornell University Press. NY, U.S.A. 212p.

Verdesio, J. 2003. Políticas públicas para la difusión de las nuevas energías renovables. Coloquio: “Energía, reformas estructurales y desarrollo en América Latina”. Brasil. Consultado el 18 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.unb.br/fav/renova/INDEX.html>

Wallace, G., W.R Russell., J.A., M.C. Lomax Jarvis., C. Lapierre and A. Chesson. 1995. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. *Carbohydrate Research*. 272: 41-53.

Watanabe, T. 2003. Analysis of native bonds between lignin and carbohydrate by specific chemical reactions. *In: Koshijima, T. y Watanabe, T (eds.): Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues*. Springer Series in Wood

Science. pp: 91-130.

Wayman, M. and M.G.S. Chua, 1979. Characterization of autohydrolysis aspen (*P. tremuloides*) lignins. Part 4: Residual autohydrolysis lignin. Canadian Journal of Chemistry. 57: 2612-2616.

Wilkie, K. C. B. 1979. The hemicelluloses of grasses and cereals. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 36: 215-264.

Wiselogle, A. E., F.A. Agblevor, D.K. Johnson, S, Deutch, J.A. Fennell, and M.A. Sanderson. 1996. Compositional changes during storage of large round switchgrass bales. Bioresource Technology. 56: 103-109.

Wilson, D.B. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. Annals of the New York Academy of Sciences. 1125: 289–297.

Worldwatch. 2007. Biofuels for Transportation: Global Potential and Implications for Sustainable Agriculture and Energy in the 21st Century. Washington, DC: Worldwatch Institute. pp: 112-154.

Yacobucci, B. D. 2010. Intermediate-Level Blends of Ethanol in Gasoline, and the Ethanol “Blend Wall”. Congressional Research Service. Consultado el 10 de diciembre de 2014. Disponible en: <http://fas.org/sgp/crs/misc/R40445.pdf>

Yu, H., R.G. Liu, D.W. Shen, Y. Jiang and Y. Huang. 2005. Study on morphology and orientation of cellulose in the vascular bundle of wheat straw. Polymer. 46: 5689–5694.

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE PASTO TOLEDO (*Brachiaria brizantha* Sin. *Urochloa brizantha* CIAT 26110) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

3.1 RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la biomasa de *Urochloa brizantha* (CIAT 26110) cv. Toledo, como materia prima para la producción de bioetanol. Se determinó la producción anual de biomasa, poder calorífico, composición química, análisis inmediato y rendimiento teórico de bioetanol en seis frecuencias de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del rebrote). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). El mayor ($p < 0.05$) contenido de celulosa y hemicelulosa fue 44.1 y 30.1 %, a 150 y 60 días de rebrote, respectivamente. El menor ($p < 0.05$) contenido de lignina de 16.2 %, al cortar la biomasa cada 60 días. El mayor ($p < 0.05$) contenido de cenizas y proteína, a 30 días de corte, son respectivamente 9 y 8 %. El poder calorífico no difiere entre frecuencias de corte ($p > 0.05$). La frecuencia de corte a 180 días, acumuló la mayor ($p < 0.05$) producción de biomasa con $27.95 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$; el mayor ($p < 0.05$) porcentaje de holocelulosa con 73.6 %; y el mayor ($p < 0.05$) rendimiento de bioetanol con $281.3 \text{ L t MS}^{-1}$. Las características químicas y rendimiento de biomasa, destacan el potencial de *Urochloa brizantha* CIAT 26110 para producir bioetanol en áreas tropicales.

Palabras clave: *Urochloa brizantha*, bioetanol, composición química, análisis inmediato, poder calorífico.

EVALUATION OF BIOMASS LIGNOCELLULOSIC PASTURE TOLEDO (*Brachiaria brizantha* CIAT 26110) FOR THE PRODUCTION OF BIOETANOL

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the biomass of *Urochloa brizantha* (CIAT 26110) cv. Toledo, as feedstock for bioethanol production. The annual biomass yield, calorific value, chemical composition, proximate analysis, and theoretical ethanol yield were determined at six cutting frequencies (30, 60, 90, 120, 150, and 180 days after regrowth). The data were analyzed using the SAS GLM procedure and the average values of treatments were compared with Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The higher content of cellulose and hemicellulose ($p < 0.05$) was 44.1 and 30.1%, at 150 and 60 days after cutting, respectively. The lower lignin content ($p < 0.05$) was 16.2%, at 60 days of cutting. The higher content of ash and protein ($p < 0.05$) were 9 and 8%, at 30 days of cutting, respectively. The gross calorific value was not different among cutting frequencies ($p > 0.05$). The cutting frequency of 180 days gave the highest ($p < 0.05$) accumulated biomass yield with $27.95 \text{ t ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$; greater holocellulose content ($p < 0.05$) with 73.6 %; and the highest theoretical ethanol yield ($p < 0.05$) with $281.3 \text{ L t DM}^{-1}$. The chemical characteristics and biomass yield highlight the potential of *Urochloa brizantha* CIAT 26110 for bioethanol production in tropical areas.

Keywords: *Brachiaria brizantha*, bioethanol, chemical composition, proximate analysis, calorific value.

3.2 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han desarrollado diversas investigaciones con la finalidad de encontrar fuentes energéticas que sustituyan paulatinamente a los combustibles fósiles. Actualmente, el interés de los biocombustibles, especialmente para ser utilizado en el sector transporte se debe especialmente a cuatro factores: I) seguridad del suministro de energía; II) disminución de las reservas de hidrocarburos; III) volatilidad del precio del petróleo y, IV) mitigación de los efectos del cambio climático.

Los biocombustibles de primera generación, producidos a base de maíz y caña de azúcar, impulsaron el aumento de precios de los alimentos en los años 2007 y 2008, causando inestabilidad económica, lo cual ocasionó que se cuestionará el papel de los biocombustibles en la crisis alimentaria. Por tal motivo, los biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica surgen como alternativa, debido a que la materia prima es abundante, y no causa volatilidad en el precio de los alimentos para consumo humano.

La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y la lignina (Demirbas *et al.*, 2004). Los tres polímeros se encuentran entrelazados en una matriz densa, creando retos para el proceso de bioconversión (Atchison y McGovern, 1983; Sjöström, 1993). La celulosa es un polímero de cadena lineal que consiste en unidades de glucosa conectadas a través de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. La hemicelulosa es un material heterogéneo constituido principalmente por cinco azúcares, incluidos la glucosa, galactosa, manosa, xilosa, y arabinosa. La lignina se compone de compuestos fenólicos que pueden actuar como inhibidor de la hidrólisis o fermentación de azúcares (Ando *et al.*, 1986; Robinson *et al.*, 2002).

Las investigaciones han demostrado que la relativa dificultad de bioconversión depende particularmente de la composición química de cada materia prima, y que las bioconversiones más fáciles se consiguen con biomasa proveniente de herbáceas (Fenske *et al.*, 1998). La fermentación de estas fracciones de azúcar puede resultar en rendimientos de etanol de 95 % del máximo teórico, que es 510g kg^{-1} de azúcar (Gregg *et al.*, 1998; Lawford *et al.*, 1999). Las estimaciones del rendimiento de bioetanol por

gramo de materia prima sin procesar se pueden establecer al conocer que la densidad de etanol al 100 % es de 790 kg/m³. Los rendimientos de etanol a partir de biomasa lignocelulósica tienen un rango potencial entre 0.11 y 0.27 m³ por tonelada de materia seca (ORNL, 2006).

Se han estudiado gramíneas (*Poaceae*), de rápido crecimiento, como fuente de materia prima, las tres principales son: *Panicum virgatum* (Sarath *et al.*, 2008), *Pennisetum purpureum* (Anderson *et al.*, 2008), y *Miscanthus x giganteus* (Murnen *et al.*, 2007).

El objetivo general es evaluar química y energéticamente la biomasa lignocelulósica de *Urochloa brizantha* (Sin. *Brachiaria brizantha*; CIAT 26110) var. Toledo, a seis frecuencias de corte, y determinar su rendimiento teórico a bioetanol.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Localización del área de estudio

El rendimiento de biomasa se evaluó en el Sitio Experimental “Papaloapan” de INIFAP, a 18° 06' N y 95° 31' O y 65 msnm, en Cd. Isla, Veracruz, con clima Aw₀ y temperatura media de 25.7 °C (García, 1988); suelo acrisol órtico, franco-arenoso, pH de 4 a 4.7, pobre en materia orgánica, nitrógeno, calcio, potasio y contenidos medios a altos de fósforo y magnesio (Enríquez y Romero, 1999). Las determinaciones físico-químicas de materia seca (MS) del forraje, se realizaron en el Laboratorio para Materiales Lignocelulósicos de INIFAP, San Martinito, Puebla, con excepción del contenido de N, el cual se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos y química ambiental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Se determinó: rendimiento de biomasa; composición química: extractivos, holocelulosa, celulosa, lignina y N; análisis inmediato: humedad, carbono fijo, material volátil y cenizas y, poder calorífico.

3.3.2 Establecimiento de parcelas

La siembra se realizó el día 22 de julio de 2011, en líneas corridas con separación

entre surcos de 0.50 m en parcelas experimentales de 5 metros de ancho por 16 metros de largo, con tres repeticiones. Se aplicaron dos fertilizaciones a los 43 y 112 días después de la siembra, con la fórmula 120-80-00 kg/ha de N y P₂O₅, respectivamente.

3.3.3 Rendimiento de biomasa

El rendimiento de biomasa (MS ha⁻¹) se determinó a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del rebrote (frecuencias de corte), durante un período de 365 días. En cada parcela, se lanzó al azar y en cinco ocasiones, un marco cuadrado de metal de (7 m²) y se cortó el forraje total (planta entera) a 20 cm de altura. La biomasa cosechada se pesó en balanza de precisión (Ohaus, Mod. GT-4000), con capacidad 6.200 kg ± 0.1g Posteriormente, se tomó una submuestra de dos plantas, se registró el peso fresco y se introdujo en una estufa de aire forzado (Felisa, Mod. FE-243A), a 55°C hasta peso constante. Las muestras fueron pulverizadas en un molino Wiley® (Arthur H. Tomas, Philadelphia, PA, USA) y tamizadas entre las mallas del No. 40 (0.42 - 1.00 mm) y No. 60 (0.25 – 0.42 mm), para determinar composición química, análisis inmediato y poder calorífico.

3.3.4 Composición química

Liberación de extractivos con etanol-benceno y etanol

Para la liberación de extractivos, se utilizó la norma TAPPI T-264 probablemente sea T 264. El protocolo consistió en colocar en un dedal de extracción 4 g de biomasa seca y molida (suficiente para todo el análisis químico) en un equipo de extracción tipo Soxhlet con 150 ml de la mezcla etanol-benceno (1:2 v/v). El calentador se ajusta a una temperatura donde la velocidad de evaporación recircule el solvente 6 veces por hora, durante 6 horas. A continuación, el dedal es lavado con etanol hasta desaparecer el olor a benceno, entonces es secado a 105±3 °C hasta alcanzar un peso constante. Consecutivamente, se repite el procedimiento de extracción utilizando solamente etanol al 95 % como solvente, en este caso la muestra al final es lavada con agua destilada para eliminar los residuos de etanol, y es secada nuevamente a 105±3 °C. Una vez efectuadas las dos extracciones, la muestra es transferida con 500 ml de agua destilada

a un Erlenmeyer de 1L, inmerso en Baño María por tres horas. Finalmente, la muestra es lavada y filtrada en un embudo Büchner con agua destilada caliente, hasta que el agua filtrada sea incolora. La muestra resultante es secada completamente a 105 ± 3 °C para poder ser utilizada en las siguientes determinaciones. El contenido de extractivos se calculó con la ecuación siguiente:

$$\text{Extractivos (\%)} = (Pe - Prs) / Pm$$

Donde: Pe es el peso seco del extracto, Prs es el peso seco del residuo del solvente y Pm es el peso seco de la muestra de materia seca.

Determinación de holocelulosa

El contenido de holocelulosa se determinó usando el método de cloración (Rowell *et al.*, 2005). A 2.5 g de muestra libre de extractivos se agregan 80 ml de agua destilada caliente, 0.5 ml de ácido acético y 1 g de clorito de sodio. La mezcla se calienta a 70 °C durante 60 min, posteriormente se agrega nuevamente 0.5 ml de ácido acético y 1 g de clorito de sodio; lo anterior se repite cada hora hasta completar un total de seis ocasiones. Luego de la adición final, se deja reposar la muestra por 24 h. Finalmente, la holocelulosa es lavada con acetona hasta eliminar el olor a clorito, para introducir la muestra en la estufa y secar hasta peso constante. El contenido de holocelulosa se determinó de acuerdo a la expresión siguiente:

$$\text{Holocelulosa (\%)} = \text{Peso de holocelulosa} / \text{Peso seco de la muestra sin extractivos} * 100$$

Determinación de celulosa y hemicelulosa

El contenido de celulosa se determinó conforme a la norma ASTM D1103; se tomaron 2 g de holocelulosa libre de extractivos y se agregaron 10 ml de NaOH al 17.5 % a una temperatura constante de 20 °C en un baño termostático. Después, a intervalos de 5 min se agregan 5 ml de la solución de NaOH hasta completar 25 ml de NaOH. Después se dejó la muestra a temperatura de 20 °C durante 30 min, para alcanzar un total de 45 min. Pasados los 45 min se agregaron 33 ml de agua destilada a 20 °C y el sólido se dejó reposar por 1 hora antes de filtrar.

Se utilizaron crisoles GOOCH para la filtración, y se agregaron 15 ml de ácido

acético al 10 % por 3 min. Posteriormente, se retiró el remanente de ácido acético por succión y se efectuaron lavados con agua destilada hasta que la concentración de ácido fue la mínima posible. La muestra se introdujo a la estufa y se secó hasta peso constante.

El contenido de celulosa se calculó con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Celulosa} = (\text{Peso celulosa} \times 100) / \text{Peso anhidro de la muestra}$$

El contenido de hemicelulosa se obtuvo como:

$$\% \text{ de Hemicelulosa} = (\% \text{ holocelulosa}) - (\% \text{ celulosa})$$

Determinación de lignina

Para la determinación de lignina se utilizó la norma TAPPI T-222 os-74. En un vaso de precipitado de 100 ml, a una muestra de 1 g de muestra anhidro y libre de extractos se le agregaron 15 ml de ácido sulfúrico al 72 %, manteniéndose durante dos horas en baño maría a 20 ± 1 °C con agitación constante. Después se vertió completamente el contenido total del vaso de precipitado a un matraz Erlenmeyer de 1L con aproximadamente 400 ml de agua destilada, hasta alcanzar un volumen de 575 ml. Entonces se hirvió a reflujo por 4 horas.

Finalmente, la solución se decantó manteniendo el matraz inclinado hasta la sedimentación de la lignina, y así filtrar a través de un crisol tipo GOOCH de porosidad fina. Se lavó con agua caliente y se secó a 105 ± 3 °C hasta alcanzar peso constante. El porcentaje de lignina se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Lignina} = (\text{Peso de lignina} \times 100) / \text{Peso anhidro de la muestra}$$

Determinación de nitrógeno

El contenido de nitrógeno vegetal se determinó por el método semi-micro Kjeldahl (AOAC-984.13; 1990). El método comprende tres etapas: digestión, destilación y titulación. Consiste en mineralizar la muestra con ácido sulfúrico concentrado y

alcalinizar con hidróxido de sodio. El amoníaco liberado es arrastrado por destilación y recogido sobre ácido bórico. La posterior valoración con ácido clorhídrico permite el cálculo de la cantidad inicialmente presente de proteína en la muestra.

Digestión: Se pesó alrededor de 1 gramo de muestra perfectamente molida y homogeneizada en un papel exento de nitrógeno y se introdujo en un tubo de digestión. Se añadió al tubo con muestra 10 g de catalizador Kjeldahl, 25 ml de ácido sulfúrico al 96 % (d=1.84), y algunos gránulos de piedra pómez tratada. Posteriormente, se colocaron los tubos de digestión con la muestras en el Bloc-Digest con el colector de humos funcionando. Se realizó la digestión a una temperatura entre 350 y 420°C, por tiempo de 1h. Se debe dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente y evitar la precipitación agitando de vez en cuando. Después, agregar lentamente 50 ml de agua destilada en cada tubo muestra. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.

Destilación: Agregar 50 ml de ácido bórico y dos gotas de indicador mixto en un matraz Erlenmeyer de 250ml a la salida del refrigerante. Programar el equipo para dosificar 50ml de NaOH. Posteriormente, introducir el tubo con la muestra en el destilador para iniciar la destilación. La destilación debe prolongarse el tiempo suficiente para que se destile un mínimo de 150 ml, aproximadamente de 5 a 10 minutos.

Ensayo en blanco: Después de la destilación de una muestra, realizar un ensayo en blanco, aplicando el método de destilación, pero utilizando 5 ml de agua destilada en el tubo donde se coloca la muestra.

Titulación: Valorar con ácido clorhídrico 0.25N el destilado obtenido, hasta que la solución vire de verde a violeta.

Calcular la cantidad de nitrógeno detectado:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = 1.4 \times (V1-V0) \times N / P$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times F$$

Donde:

P= Peso en g de la muestra.

V1 = Volumen (ml) de HCl consumido en la valoración

N = Normalidad del HCl

V0 = Volumen de HCl (ml) consumido en la valoración del blanco.

F = Factor de conversión para pasar de contenido en nitrógeno a contenido en proteínas, en este caso 6.25.

Para la determinación de la composición química se tomaron dos repeticiones por muestra, realizando seis determinaciones en cada frecuencia de corte.

3.3.5 Análisis inmediato

Humedad

Para el análisis de humedad se utilizó la Norma ASTM E871. Se colocó un peso aproximado a 1 g en un crisol de porcelana y se secó en una estufa a 105 °C durante 24 horas. La muestra se retiró de la estufa, y el crisol se coloca en un desecador por 15 min, previo al nuevo registro del peso de la muestra. El contenido de humedad se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ de Humedad} = A - B / A - C \times 100$$

Donde A: crisol más masa de la muestra original. B: crisol más masa seca. C: crisol vacío.

Material volátil

El material volátil se determinó de acuerdo con la norma ASTM E872. Aproximadamente 1 g de muestra anhidro, se introduce en una mufla a una temperatura de 900 °C fuera del contacto con el aire durante 7 minutos.

Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de MV} = 100 (A-B) - MC(A - C)/(A - C)*100$$

Donde A: masa del crisol más la muestra original, B: masa del crisol más la muestra volatilizada, C: masa del crisol vacío y MC: contenido de humedad.

Cenizas

La determinación de cenizas se realizó siguiendo la norma estándar ASTM D 1102-84. Se calcinó un crisol adecuado para 1 g de muestra a 600 °C en una mufla durante 1 hora. Posteriormente se retiró e introdujo en un desecador durante 15 min para después tararlo. Entonces, se agregó 1 g de muestra en el crisol, previamente tamizada y seca, registrando el peso inicial. Se introdujo la muestra a la mufla a 100°C, paulatinamente se aumentó la temperatura de modo que no hubiera ignición en la muestra hasta los 600°C. Después de hora y media se revisó la muestra, extrayendo el crisol con una pinza, de modo que el material sea solamente cenizas (color grisáceo blancuzco), de lo contrario se mantuvo la muestra por mayor tiempo en la mufla. Finalmente, la muestra se colocó en un desecador por 15 min. Para luego registrar el peso final. El porcentaje de cenizas se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Cenizas} = (P.F - P.I) \times 100\%$$

Donde, P.I.= Peso inicial, P.F.= Peso final. *Nota: La ecuación es válida si la muestra utilizada es de 1 gramo.

Carbono fijo

Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Carbono fijo (CF)} = 100 - (\text{Humedad} + \text{Cenizas} + \text{Material Volátil})$$

Para las determinaciones del análisis inmediato se tomaron tres repeticiones por muestra, realizando nueve determinaciones por cada frecuencia de corte.

3.3.6 Poder calorífico

Se determinó en un calorímetro de bomba (Isoperibol, Parr 1266) acorde a la norma

ASTM (E711) y a una temperatura de 30 ± 0.5 °C, con pastillas comprimidas de un peso igual o menor a 1 g. Al mismo tiempo, se determinó el contenido de humedad de las muestras en una balanza de humedad Ohaus MB45®, previamente calibrada.

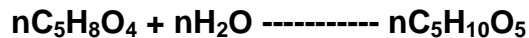
Se realizaron cinco determinaciones por muestra, realizando 15 repeticiones en cada frecuencia de corte.

3.3.7 Estimación del rendimiento teórico de bioetanol

El proceso de transformación de glucosa a etanol es un proceso biológico denominado fermentación alcohólica, en el cual por la mediación del metabolismo energético de microorganismos como levaduras y bacterias, la fuente de carbono se oxida parcialmente hasta etanol (Kosaric, 2011).

Los procesos de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa se desarrollan según las siguientes ecuaciones estequiométricas (Castaño, 2008):

Hidrólisis de pentosanos a pentosas:

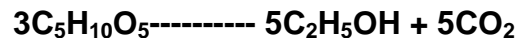


Hidrólisis de hexosanos a hexosas:



Teóricamente la conversión de celulosa en glucosa es 1.111 g glucosa/g celulosa y de hemicelulosa en xilosa es 1.136 g glucosa / g xilosa.

Las siguientes ecuaciones estequiométricas corresponden a la fermentación de pentosas y hexosas a etanol:



1g 0.511g 0.489g



1g 0.511g 0.489g

De acuerdo a las reacciones, el rendimiento máximo teórico es 0.51 Kg de bioetanol y 0.49 Kg de dióxido de carbono por kg de glucosa y xilosa (Balat *et al.*, 2008).

Para la estimación del rendimiento teórico de bioetanol es necesario el rendimiento de biomasa seca y, la cantidad de celulosa y hemicelulosa de la materia prima. Además, se utilizan valores de eficiencia para el proceso de hidrólisis de celulosa y hemicelulosa a azúcares fermentables, de 76 y 90 %, respectivamente. Asimismo, los valores de conversión de glucosa a etanol del 75 % y de xilosa a etanol de 50 % (Castaño, 2008). Se calculó el rendimiento teórico a bioetanol con base en la fórmula descrita por Castaño (2008).

Metodología descrita por Castaño (2008):

Celulosa: Litros de bioetanol / tonelada de biomasa = Kg de celulosa por tonelada de biomasa x Factor de conversión de glucosa a partir de celulosa (1.111kg de glucosa / kg de celulosa) x Eficiencia de procesos de glucosa a partir de celulosa (0.76) x Factor de conversión de etanol a partir de glucosa (0.511 kg de etanol/kg de glucosa) x Eficiencia del proceso de etanol a partir de celulosa (0.75) x densidad del etanol (0.78 ton/m³).

Hemicelulosa: Litros de bioetanol / tonelada de biomasa = Kg de hemicelulosa por tonelada de biomasa x Factor de conversión de glucosa a partir de hemicelulosa (1.136kg de glucosa / kg de hemicelulosa) x Eficiencia de procesos de glucosa a partir de hemicelulosa (0.90) x Factor de conversión de etanol a partir de glucosa (0.511 kg de etanol / kg de xilosa) x Eficiencia del proceso de etanol a partir de hemicelulosa (0.50) x densidad del etanol (0.78 ton / m³).

Se suman las fracciones de celulosa y hemicelulosa para obtener el rendimiento teórico de bioetanol por unidad de biomasa

Asociado a lo anterior, se calculó en cada frecuencia de corte la cantidad anual de bioetanol (litros) que produce una hectárea de pasto Toledo. El procedimiento consistió en multiplicar el rendimiento teórico de bioetanol por unidad de biomasa, por el rendimiento anual de biomasa.

3.3.8 Análisis estadístico

Mediante el procedimiento GLM de SAS se aplicó análisis de varianza para un diseño experimental de bloques al azar con arreglo de parcelas divididas; en donde, la parcela grande es el genotipo y la parcela chica, la frecuencia de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después de rebrote) con tres repeticiones. Se calculó la diferencia significativa de Tukey ($\alpha= 0.05$) para la comparación de medias y un análisis de correlación entre variables. Se analizaron los datos con el propósito de estimar el efecto de frecuencia de corte, mediante el paquete estadístico SAS para Windows versión 9 (SAS, 2002).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Rendimiento de biomasa

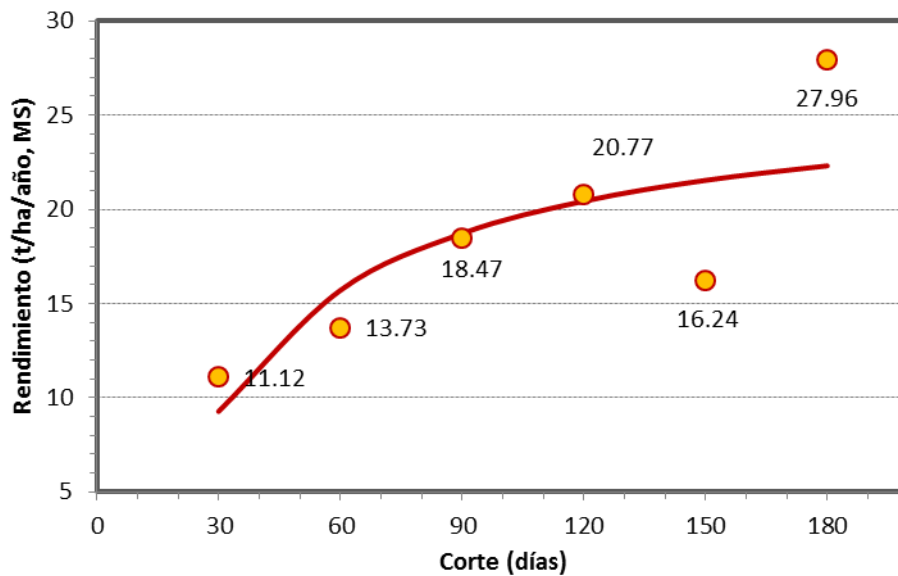
El análisis de acumulación de biomasa de Toledo indica que existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre el rendimiento acumulado de biomasa anual y la frecuencia de corte. Anualmente, al realizar cortes cada 30 días, la suma de doce cortes acumula $11.12 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de biomasa, por otro lado, al realizar cortes cada 180 días, la suma de dos cortes acumula $27.96 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de biomasa; 16.84 toneladas más, al cosechar cada 180 días (Cuadro 3; Fig.1). Además del mayor rendimiento de biomasa, los sistemas de producción con menos cosechas anuales requieren menos energía, en comparación a sistemas de dos o más cosechas (Sanderson *et al.*, 1999). La producción de biomasa, en materia seca, aumentó a medida que la frecuencia de corte fue mayor, con excepción del corte realizado cada 150 días, donde la cantidad de biomasa disminuyó en 21.85 %, respecto a la frecuencia de corte 120.

Cab *et al.*, (2007), reportan rendimientos de biomasa de Toledo de 16.79 t ha^{-1} , bajo condiciones similares y realizando cortes en promedio cada 32 días. Switchgrass (*Panicum virgatum*) es estudiado para fines energéticos y considerado materia prima viable por sus altos rendimientos de biomasa, que comprenden de 17.27 t ha^{-1} (Parrish *et al.*, 2005) a 37.6 t ha^{-1} biomasa seca (Thomason *et al.*, 2007). Híbridos de *Miscanthus sinensis* con fines energéticos en las regiones del norte de Europa, tienen rendimientos

de 25 t ha⁻¹; en regiones de medio y sur de Europa con *Miscanthus giganteus* se reportan rendimientos máximos de 38 t ha⁻¹ (Lewandowski, 2003).

El incremento de la proporción de pared celular con la edad del pasto, es posiblemente, la principal causa de mayor producción de materia seca, además de la influencia de factores como: disponibilidad de agua, fertilización, presencia de plagas y enfermedades, desarrollo radical y época del año. A edades avanzadas, se producen cambios como disminución de láminas foliares y aumento de haces vasculares (Mari *et al.*, 2004).

Figura 1. Rendimiento anual de biomasa seca de pasto Toledo, a seis frecuencias de corte.



En general, el rendimiento de biomasa en Toledo es inferior a los reportados en *Miscanthus* y *Switchgrass*; sin embargo, las condiciones de producción y sitio de crecimiento son variables que influyen sobre el rendimiento de biomasa. Por tal motivo, los datos establecidos en los diferentes experimentos son útiles como referencia, ya que las evaluaciones deben ser específicas en cada ambiente, para lograr determinar con mayor exactitud las proyecciones de biomasa a lo largo del tiempo.

3.4.2 Poder calorífico y contenido de humedad

La relación entre frecuencias de corte y contenido de humedad evidenció diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), el intervalo fue de 6.8 a 8.4 %, a los 30 y 150 días, respectivamente. Materias primas con mayor humedad reducen la eficiencia del balance energético global, debido a que demandan mayor energía para el proceso de secado (Kollmann, 1959).

El poder calorífico crece a medida que se lignifican los tejidos y disminuye con el aumento del contenido de humedad. Las sustancias extraíbles también muestran relación, ya que suelen incrementar el poder calorífico, sobre todo si aumentan las resinas (Kollmann, 1959). La combustión es el proceso de conversión termoquímica más conocido y ampliamente utilizado, ya que tradicionalmente ha constituido la fuente de energía más importante.

La biomasa más empleada es la leña, con un poder calorífico en torno a los 20 MJ kg^{-1} . La caracterización del poder calorífico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las seis frecuencias de corte (Cuadro 3). El rango observado fue de 16.33 MJ kg^{-1} a los 60 días y 16.72 MJ kg^{-1} a los 150 días de corte. Los datos indican que el poder calorífico no tiene relación con la frecuencia de corte, contrario a las especies maderables, donde influye directamente la edad del árbol. El poder calorífico de maderas de coníferas en base seca es 20.5 MJ kg^{-1} y en maderas de latifoliadas 20.2 MJ kg^{-1} (CEN/TS, 2005). En Switchgrass se reportan valores de 18.06 MJ kg^{-1} (Jenkins *et al.*, 1998) y 17.4 (McKendry, 2002). Por su parte, en Miscanthus el poder calorífico se estima en 18.5 MJ kg^{-1} (McKendry, 2002). El poder calorífico promedio del pasto Toledo es 16.52 MJ kg^{-1} , valor inferior al reportado en otros pastos utilizados con fines energéticos.

Por otro lado, la producción anual de energía, al cosechar Toledo cada 180 días (dos cortes anuales), nos proporciona la mayor cantidad con 466.56 GJ ha^{-1} . Al comparar los valores con plantaciones de Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) en Brasil, con rendimientos anuales de 24 ton ha^{-1} (Roger *et al.*, 2011), la cantidad de energía anual por hectárea es 448.52 GJ, valor inferior al obtenido con Toledo.

Cuadro 3. Caracterización energética de pasto Toledo a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte (días)	Rendimiento (t ha ⁻¹ año ⁻¹)	Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)	Producción de energía (GJ ha ⁻¹ año ⁻¹)	Humedad (%)
30	11.12 (±0.3)f	16.37 (±0.7)a	182.2 (±8.7)f	8.4 (±0.2)c
60	13.73 (±1.1)e	16.33 (±0.3)a	224.2 (±4.6)e	7.4 (±0.4)c
90	18.46 (±1.5)c	16.64 (±0.2)a	307.2 (±5.1)c	8.2 (±1.2)a
120	20.77 (±4.5)b	16.37 (±0.2)a	340.1 (±5.3)b	7.9 (±1.0)c
150	16.23 (±2.3)d	16.72 (±0.1)a	271.5 (±1.8)d	6.8(±0.1)bc
180	27.95 (±2.7)a	16.69 (±0.2)a	466.6 (±0.6)a	7.7 (±1.0)ab
MEDIA	18.40	16.52	298.7	7.79

Valores con letras diferentes presentan diferencias significativas entre cortes ($p < 0,05$).

3.4.3 Composición química

Es útil para definir la metodología de los siguientes procesos: pre-tratamiento, hidrólisis y fermentación. A continuación, se proporcionan las características químicas y los componentes estructurales del pasto Toledo, y se realiza la comparación de resultados con pastos y materias primas ya utilizadas en la industria de biocombustibles.

Extractivos

Funcionan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o forman parte de mecanismos de defensa; son los responsables del color, olor y resistencia al marchitamiento de las plantas (Olanders y Steenari, 1995). Se clasifican en categorías en función de la similitud de sus estructuras químicas, las categorías principales incluyen monosacáridos, polisacáridos, aceites volátiles, terpenos, ácidos grasos y sus ésteres, ceras, alcoholes polihidroxilados, alcaloides, y compuestos aromáticos (Goldstein, 1991).

En los resultados obtenidos se observó que el contenido total de extractivos es diferente ($p < 0.05$) entre las frecuencias de corte, el intervalo oscila entre 7.7 y 11.8 %, encontrado a los 90 y 180 días de corte, respectivamente (Cuadro 4). El menor contenido de extractivos se cuantificó a 90 días de corte con 7.7 %. Los datos reportados por Mateus *et al.* (2012), en pasto Maralfalfa son similares, al observar un 10.7 %. Lee *et al.* (2009), observaron 5.5 % en pasto Bermuda y Cardona *et al.* (2013), reportaron 16.9 % en King grass (*Pennisetum hybridum*). Basile de Castro (1994), en madera de coníferas y maderas duras citó 4 % y 1.5-2 %, respectivamente. La cantidad de extractivos depende de la especie, las características del tejido y la influencia del ambiente. Fisiológicamente los pastos tienden a acumular reservas de carbohidratos en las raíces y puntos de crecimiento, con la finalidad de removerlos al momento de rebrotar. Por lo cual, es posible que parte de los carbohidratos de reserva sean extractivos en forma de carbohidratos; motivo del mayor contenido de extractivos en pastos que en plantas leñosas. La cantidad de extractivos en pastos es mayor que en maderas (Weiler, 2004).

Los extractivos no pueden ser fermentados a etanol, por lo cual, visto de manera particular, la biomasa lignocelulósica con una mayor cantidad de extractivos, causará menores rendimientos a etanol.

Holocelulosa

La holocelulosa es la suma de celulosa y hemicelulosa, la combinación de ambos polímeros constituye una fuente de energía para las células de las plantas, y representa entre 60 y 80 % de la biomasa lignocelulósica. Alto contenido de carbohidratos, teóricamente corresponde a mayores cantidades de bioetanol. La cantidad de holocelulosa mostró diferencias ($p < 0.05$) entre las frecuencias de corte (Cuadro 4). El intervalo de valores encontrados es de 68.5 a 73.6 %. Las menores cantidades se encontraron a los 30, 60 y 90 días, posteriormente la cantidad de holocelulosa aumenta conforme a la frecuencia de corte, hasta encontrar el valor máximo con 73.6 % a 180 días, punto donde se encuentra la mayor cantidad de azúcares totales para la fermentación a bioetanol.

Los valores reportados de holocelulosa en otras especies de pasto C₄ son: Maralfalfa (56.3 %), Switchgrass (53.5 y 76.4 %), Bermuda (59.7 %) y Miscanthus (76.5%) (Mateus *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010; Sun y Cheng, 2002; Lee *et al.*, 2009; Brosse *et al.*, 2012). La mayor cantidad de holocelulosa en Toledo es 73.6 %, valor inferior al reportado en Miscanthus, similar a Switchgrass y superior a Maralfalfa y Bermuda.

Celulosa

La importancia de la celulosa se debe a que es hidrolíticamente descompuesta en glucosa, y es la principal fuente disponible para la hidrólisis y la fermentación a etanol (Aristidou y Pentilla, 2000; Sues *et al.*, 2005). Los valores determinados muestran que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la cantidad de celulosa y la frecuencia de corte; el promedio de las seis frecuencias evaluadas fue de 39.15 %. El mayor porcentaje de celulosa se encontró a los 150 días de corte con 44.1 %. En contraste, a los 30 días de cosecha, se presenta la menor cantidad con 39.4 % (Cuadro 4). El incremento de celulosa con la frecuencia de corte, podría ser el resultado del engrosamiento de la pared celular que ocurre con la madurez fisiológica de la planta.

En general, los pastos tienen valores del 25 al 40 % de celulosa (Sun y Cheng, 2002). Valores reportados para Switchgrass comprenden contenidos de celulosa de 30.97 % (Carroll y Somerville, 2009) a 45% (Sun y Cheng, 2002). En Miscanthus, un intervalo de 28 a 49 % (Hodgson *et al.*, 2010) y en Maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) un total de 33.79 % de celulosa (Mateus *et al.*, 2012). En bagazo de caña los valores varían de 35 a 45 % (Canilha *et al.*, 2010). Por otro lado Betts *et al.* (1991), indicaron que la cantidad de celulosa varía entre maderas de latifoliadas (40-55 %) y coníferas con (45-50 %). Pasto Toledo, presenta contenidos de celulosa superiores a los reportados en Switchgrass, Miscanthus y Maralfalfa; menor a las maderas y similar al reportado en bagazo de caña. La cantidad de celulosa en Toledo, es una variable que nos indica el posible potencial del pasto para producir bioetanol.

Hemicelulosa

Otra fuente de carbohidratos que compone la biomasa lignocelulósica, además de la celulosa, es la hemicelulosa, constituida de polímeros ramificados de pentosas (5-carbono) y hexosas (6-carbono), y con potencial para ser hidrolizados por hemicelulasas o ácidos para liberar azúcares como: xilosa, arabinosa, galactosa, glucosa y manosa. Se encontró que el contenido de hemicelulosa es diferente ($p < 0.05$) entre frecuencias de corte. A los 90 y 150 días se determinaron los menores contenidos con 26.7 y 28.5 %, respectivamente (Cuadro 4). Contrario a los 30 y 60 días, donde se obtuvo la mayor proporción (30 %). El promedio de las seis frecuencias evaluadas fue 29 %. Sun y Cheng (2002) reportaron 31.4 % para Switchgrass y 35.7 % para pasto Bermuda. En cinco especies de *Miscanthus*, se reporta en promedio 30.3 %, y en Maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) un total de 22.54 % de hemicelulosa (Brosse *et al.*, 2012; Mateus *et al.*, 2012). El contenido de hemicelulosa en pasto Toledo es similar en Switchgrass y *Miscanthus*; inferior al pasto Bermuda y superior a Maralfalfa. Entre mayor es cantidad de hemicelulosas, mayor es el potencial para la producción de bioetanol.

Lignina

El contenido de lignina es diferente estadísticamente ($p < 0.05$) entre las frecuencias de corte. A los 60 días se obtuvo la menor cantidad con 16.2 %, seguido de los cortes 30 y 90 con 16.8 %. Por otro lado, al corte 90 y 180 días después del reborte, se presentan los mayores contenidos con 19.5 y 18.3 %, respectivamente. El promedio observado fue 17.4% (Cuadro 4). El rango de valores comprende de 16.2 a 18.3 %; sólo un 2.1 % de variabilidad, lo cual indica que la lignificación es bastante homogénea en relación a la edad de corte.

La información sobre el contenido de lignina en cultivos herbáceos es poco uniforme en comparación con especies maderables (Buranov y Mazza, 2008). Xu (2010) reportaron para Switchgrass 21.4 % y Lee *et al.* (2009) en pasto Bermuda 23.3 %. En *Miscanthus* un contenido de 15 a 28 % (Hodgson *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012); Maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) con 22.54 % (Mateus *et al.*,

2012), y *Brachiaria humidicola* con 10.4 % (Arias y Hernández, 2002). Por su parte McKendry (2002), en maderas de coníferas observó variación de 27 a 30 % y en maderas latifoliadas de 20 a 25 %. El contenido de lignina en pasto Toledo es menor al compararlo con pasto Bermuda, Switchgrass, Maralfalfa y maderas, similar a *Miscanthus* y mayor a *Brachiaria humidicola*. La variación del contenido de lignina entre especies de pasto, se puede explicar a que es una característica fisiológica intrínseca, además, es posible que las condiciones ambientales influyan en la mayor o menor síntesis de lignina.

La lignina no puede ser fermentada a etanol, su presencia tiene efecto negativo en procesos fermentativos, por lo tanto, cualquier proceso viable de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, tiene que incluir su extracción y aprovechamiento en la obtención de productos de valor agregado y/o generación de energía para ser utilizada en el procesamiento de la biomasa. Un alto contenido de lignina se correlaciona con la recalcitrancia de los polisacáridos para la hidrólisis enzimática; sin embargo, el aumento de la proporción relativa del monómero siringil puede ayudar en mecanismos de conversión de biocombustibles (Li *et al.*, 2010; Chen y Dixon, 2007). La biomasa lignocelulósica con menor contenido de lignina, requerirá menor cantidad de energía invertida en el proceso de pre-tratamiento físico, además de que mayor cantidad de celulosa será susceptible para ser hidrolizada y fermentada (Wayman y Chua, 1979). Toledo, presentó valores inferiores de lignina en comparación con valores reportados para otras biomásas lignocelulósicas, lo cual es benéfico, ya que se demandará menor cantidad de energía en el proceso de pre-tratamiento, y aumentará la eficiencia del proceso de obtención de bioetanol.

Proteína

La cantidad de proteína es diferente estadísticamente ($p < 0.05$) entre frecuencias de corte. El contenido de proteína disminuye a medida que la planta madura. La mayor cantidad se encontró a los 30 días con 8.2 %, en contraste con los valores determinados de 2.4 y 2.8 %, en las frecuencias de 150 y 180 días, respectivamente (Cuadro 4). Rincón *et al.* (2008), determinaron un porcentaje de 11.2 % de proteína

cruda en pasto Toledo, a los 28 días después de rebrote; valor superior al encontrado en este estudio. Alves do Santos *et al.* (2001), al evaluar *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Roxo, observaron a los 40 días de edad, 12.89 % de proteína, y 5.36 % a los 100 días de edad. Chacón-Hernández y Vargas-Rodríguez (2009), en King grass (*Pennisetum purpureum*) a tres edades de corte 60, 75 y 90 días, determinaron valores de proteína cruda de 9.5, 8.7 y 8.4 %, respectivamente. Los valores de proteína determinados en Toledo son inferiores a los reportados en pasto King grass y Roxo.

El tipo de tejido, la composición morfológica, así como la disponibilidad de agua, época del año, cantidad y disponibilidad de nitrógeno en el suelo, entre otros factores, influyen en la cantidad de proteína en los pastos. La disminución en la proteína al aumentar la edad del pasto se puede atribuir a la reducción de la actividad metabólica, es decir, una menor síntesis de compuestos proteicos en la planta, por lo cual, a medida que aumenta la edad del pasto disminuye la cantidad de la proteína (Ramírez *et al.*, 2008).

La cantidad de proteína no es un componente principal de los cultivos energéticos lignocelulósicos, la mayoría de las tecnologías de biorrefinería que se centran en la conversión de lignocelulosa no extraen las proteínas de la biomasa. En su lugar, la incorporan en el residuo sólido para la hidrólisis. En cuanto a las tecnologías termoquímicas, el nitrógeno es volátil y se perderá en su mayoría en la fase gaseosa. La importancia de la cantidad de proteína en la obtención de bioetanol, radica en que a mayor cantidad de nitrógeno, se reduce la bioconversión de los azúcares totales a bioetanol, debido a que las proteínas de la pared celular forman puentes con el ácido ferúlico, dándole gran resistencia e insolubilidad a toda la estructura (Bidlack *et al.*, 1992).

Cuadro 4. Composición química de pasto Toledo a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte (días)	Componente (%)					
	Holocelulosa*	Celulosa*	Hemicelulosa*	Lignina*	Extractivos	Proteína
30	69.5 (±1.0)cd	39.4 (±0.5)d	30.1 (±0.9)a	16.8 (±0.5)c	10.1 (±0.4)bc	8.2 (±0.8)a
60	71.3 (±1.6)cd	41.3 (±1.0)c	30.0 (±0.6)a	16.2 (±0.2)c	10.8 (±0.7)abc	4.8 (±1.1)b
90	68.5 (±1.2)d	41.7 (±0.8)c	26.7 (±0.5)c	19.5 (±1.6)a	7.7 (±0.3)d	4.3 (±0.5)bc
120	71.5 (±0.9)b	42.6 (±1.4)bc	28.9 (±0.7)ab	16.8 (±0.1)c	9.4 (±1.1)c	4.3 (±1.5)bc
150	72.7 (±0.8)ab	44.1 (±0.5)a	28.5 (±0.7)b	17.1 (±0.3)bc	11.5 (±0.5)ab	2.4 (±0.3)c
180	73.6 (±1.1)a	43.7 (±0.4)ab	29.9 (±0.7)ab	18.3 (±0.6)ab	11.8 (±1.8)a	2.8 (±1.7)c
MEDIA	71.1	42.1	29.0	17.4	10.2	4.5

- *Valores con base al material anhidro libre de extractos, Valores con letras diferentes presentan diferencias significativas entre cortes ($p < 0,05$).*

3.4.4 Análisis inmediato

El análisis inmediato nos indica la reactividad, facilidad de ignición y combustión de la biomasa. Permite predecir la energía química almacenada en la biomasa en forma de materia volátil y carbono fijo. Consiste en una separación de los compuestos de la muestra de combustible en función de sus diferentes volatilidades al calentarlo de forma gradual, proporcionando los contenidos de humedad, cenizas, materia volátil y carbono fijo.

Humedad

Un mayor contenido de humedad en la biomasa impide el encendido, provoca problemas de transporte y produce gases. Para la conversión térmica de biomasa, son de interés materias primas que posean baja humedad, preferentemente con un contenido de humedad (<50 %). Se podrían usar materiales con mayor humedad pero el balance energético global para el proceso de conversión se ve perjudicado por los procesos de secado (Lewandowski y Kicherer, 1997). Los porcentajes de humedad determinados en Toledo, después del secado, se encuentran entre 7.1 y 8.4 % (Cuadro 5). El único porcentaje de humedad que mostró diferencia ($p < 0.05$) entre frecuencias de corte, se observó a los 150 días de corte con 7.1 %. McKendry (2002) reporta un 11.5 % de humedad para *Miscanthus*, 13-15 % en *Switchgrass*, 20 % en madera y 6 % en paja de cereales.

Cenizas

En el presente estudio la cantidad de cenizas disminuye a medida que la frecuencia de corte es mayor, lo que se reflejó en diferencias ($p < 0.05$) entre frecuencias de corte (Cuadro 5). Se determinó como máximo, 9 % de ceniza a los 30 días de corte. Los valores mínimos fueron 5.2 y 5.3 % a los 150 y 180 días, respectivamente. Valores reportados de cenizas en diversos pastos con interés energético son similares: 3.8 % en *Switchgrass*, 4.8 % en pasto Bermuda, y 2.46 % en pasto Maralfalfa. (Lee *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Mateus *et al.*, 2012). Chacón-Hernández *et al.* (2009), en King grass (*Pennisetum purpureum*) a tres edades de corte, reporta a los 60, 75 y 90 días de

rebrote, valores de cenizas de 14.5, 13.8 y 13.6 %, respectivamente.

Los valores encontrados en el presente estudio son superiores a los encontrados en Switchgrass, Bermuda y Maralfalfa, y menores a los reportados para King grass. La cantidad de cenizas presenta en la biomasa, dependerá de la etapa de crecimiento, época del año y ubicación geográfica. Las plantas herbáceas generalmente tienen mayor contenido de cenizas y sílice que las maderas (Atchison y McGovern, 1983).

Las cenizas no tienen valor energético, y altos contenidos de éstas, reducen el rendimiento en el proceso de obtención de bioetanol, por ejemplo: en la etapa de hidrólisis ácida, un mayor contenido de cenizas puede implicar un mayor consumo de ácido, debido a la naturaleza alcalina de parte de las cenizas (Hayes, 2011).

La lixiviación de la biomasa almacenada puede reducir el nivel de compuestos inorgánicos en algunos casos (Wiselogel *et al.*, 1996). En el proceso de combustión, el conocimiento de la concentración de cenizas es necesario para mejorar la eficiencia de la operación, y reducir los costos asociados con la producción de escoria (Subero, 2010). Como alternativa, las cenizas originadas en la combustión pueden utilizarse como regeneradores de suelos ácidos ya que son completamente inocuas.

Materia volátil

El contenido en volátiles constituye una variable importante, ya que indica la reactividad, facilidad de ignición y velocidad de combustión de la biomasa (Basu, 2010).

La cantidad de materia volátil mostró diferencia ($p < 0.05$) entre frecuencias de corte; los mayores porcentajes fueron 78.4 % a 150 días y 78.2 % a 180 días; contrario a los 30 días, donde se determinó el menor porcentaje con 73.6 % (Cuadro 5). McKendry (2002) determinó 66.8 % de material volátil en Miscanthus y 79 % en paja de cereales. Yin (2011) reporta en Switchgrass 76.6 %, 83.6 % en bagazo de caña y 79.8 % en residuos forestales. Vamvuka *et al.*, (2003) reportó 79.8 % para residuos forestales. El contenido de materia volátil en Toledo, es similar al reportado en Switchgrass, paja de cereales y residuos forestales; mayor en Miscanthus, y menor en bagazo de caña.

Carbono fijo

Es la masa resultante después de la liberación del material volátil, excluyendo la ceniza y humedad. El carbono fijo es indicativo del contenido de materia combustible que ha quedado sin quemar o parcialmente quemado en las cenizas. Se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre los porcentajes de carbono fijo y las frecuencias de corte (Cuadro 5). Los cortes cada 150 y 180 días, mostraron el menor porcentaje (16.3). Los porcentajes de carbono fijo se comportan sin grandes contrastes, con un intervalo comprendido entre 16.3 y 17.8 %. McKendry (2002) establece 15.9 % de carbono fijo para *Miscanthus* y 21 % en paja de trigo. Vamvuka *et al.* (2003) reportó 20 % para residuos forestales. El porcentaje de carbono fijo en el pasto Toledo es inferior al reportado en paja de trigo y residuos forestales; y similar en *Miscanthus*. El carbono fijo está directamente relacionado con la masa de lignina por ser muy resistente a la descomposición térmica. Mayores cantidades de carbono fijo, causarán menores rendimientos a bioetanol.

Cuadro 5. Análisis inmediato de pasto Toledo a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte (días)	Componente (%)			
	Cenizas	Carbono fijo	Material volátil	Humedad
30	9.0 (± 0.4)a	17.2 (± 0.8)ab	73.6 (± 0.5)d	8.4 (± 0.4)a
60	8.1 (± 0.7)b	16.6 (± 1.6)ab	75.1 (± 1.4)c	7.9 (± 0.6)a
90	8.1 (± 0.5)b	17.8 (± 0.9)a	73.9 (± 1.0)cd	8.1 (± 0.6)a
120	6.4 (± 0.7)c	16.8 (± 0.6)ab	76.7 (± 0.7)b	8.1 (± 0.6)a
150	5.2 (± 0.5)d	16.3 (± 0.5)b	78.4 (± 0.5)a	7.1 (± 0.2)b
180	5.3 (± 0.5)d	16.3 (0.8)b	78.2 (± 0.8)a	7.8 (± 0.7)a
MEDIA	7.0	16.8	75.9	7.9

Valores con letras diferentes presentan diferencias significativas entre cortes ($p < 0,05$).

3.4.5 Rendimiento teórico a bioetanol

El contenido de celulosa y hemicelulosa determina el rendimiento teórico de bioetanol por unidad de biomasa. Los mayores rendimientos de bioetanol por unidad de biomasa fueron 281.3 y 278.6 L t MS⁻¹, a los 150 y 180 días de corte, respectivamente. El intervalo estimado comprende valores de 262.6 hasta 281.3 L t MS⁻¹ (Cuadro 6). El rendimiento anual de bioetanol se encuentra relacionado directamente con la producción de biomasa cosechada. El máximo rendimiento de bioetanol se estimó a los 180 días de corte, con 7865.1 L t⁻¹ año⁻¹, diferente estadísticamente (p<0.05) de las demás frecuencias de corte. El corte a los 30 días obtuvo la menor producción con 2935.6 L t⁻¹ año⁻¹ (Cuadro 6).

El análisis comparativo antes mencionado, demuestra la inviabilidad de realizar cortes en etapas tempranas del cultivo, debido al bajo rendimiento de biomasa anual, lo que ocasiona un bajo rendimiento de bioetanol. Asimismo, económicamente el costo de cosecha aumenta al realizar mayor número de cortes por año.

Cuadro 6. Rendimiento de biomasa y producción de bioetanol de pasto Toledo a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte (días)	Producción de bioetanol (L t ⁻¹)	Producción anual de bioetanol (L t ⁻¹ año ⁻¹)
30	264.3 (±3.8)cd	2935.6 (±130.3)e
60	271.6 (±6.1)bc	3720 (±445.4)de
90	262.6 (±4.6)d	4858.3(±773.3)bc
120	273.1 (±4.2)b	5677 (±1138.6)b
150	278.6 (±3.0)ab	4517.8 (±552.2)cd
180	281.3 (±4.0)a	7865.1 (±177.5)a
MEDIA	271.9	4928.9

Valores con letras diferentes presentan diferencias significativas entre cortes (p<0,05).

McKendry (2002), menciona que mediante hidrólisis enzimática se logra obtener hasta 280 L t MS⁻¹ de etanol a partir de Switchgrass y 205 L t MS⁻¹ a partir de madera. La comparación del rendimiento de bioetanol por unidad de biomasa, con otras fuentes energéticas se presenta en la Cuadro 7.

Cuadro 7. Rendimiento de bioetanol de pasto Toledo y otras fuentes de biomasa

	Producción de bioetanol (L t MS⁻¹)	Referencia
Pasto Toledo	262.6-281.3	Este estudio
Miscanthus	395-423 341-379	Godin <i>et al.</i> (2013)
Switchgrass	367-397.4 280	Laser <i>et al.</i> (2009) McKendry (2002)
Bagazo de caña	340	Forero (2009)
Maderas latifoliadas	283.9	Piccolo y Bezzo (2009)
Rastrojo de maíz	158-272 264-295	Kazi <i>et al.</i> (2010) Sendich(2008)
Desechos cítricos (Bagazo y cáscara)	160	Coll (2008)

Análisis de correlación

Se aplicó un análisis de correlación entre frecuencia de corte, rendimiento de biomasa, composición química y análisis inmediato (Cuadro 8).

La frecuencia de corte muestra correlación positiva con el rendimiento de materia seca, holocelulosa, celulosa y material volátil. Concuerta con los resultados obtenidos; a medida que la frecuencia de corte es mayor, aumenta el contenido de carbohidratos totales y materia volátil.

El porcentaje de celulosa y materia volátil presentan correlación positiva. La cantidad de celulosa aumenta conforme la cantidad de materia volátil es mayor.

La cantidad de hemicelulosas decrece a medida que aumenta el contenido de lignina. Ambos constituyentes se encuentran entrelazadas en la matriz de la pared celular; por tanto, al aumentar la lignina, existe menor cantidad de hemicelulosas.

El contenido de cenizas presenta una correlación negativa con la frecuencia de corte, rendimiento de biomasa, holocelulosa y celulosa. Lo cual se explica, debido a que al aumentar la cantidad de cenizas, disminuye el rendimiento de biomasa, y la cantidad de azúcares estructurales. Además, la planta al envejecer, contiene menor cantidad de elementos inorgánicos.

Los compuestos extractivos presentan correlación positiva con la material volátil; lo cual se explica debido a que los extractivos son una reserva de energía y favorecen la facilidad de ignición y velocidad de combustión de la biomasa, características que presenta la biomasa con alto contenido de materia volátil.

El poder calorífico se comporta de manera independiente, no mostró correlación con ninguna de las variables. Por tanto, el poder calorífico no se modifica con la variación de las variables en estudio.

Cuadro 8. Matriz de coeficientes de correlación entre frecuencia de corte, rendimiento de biomasa, composición química y análisis inmediato.

	Frec	Rend	Holo	Celulosa	Hem	Lignina	Extrac	Voláti	Hume	Cenizas	C. fijo	P. calor
Frecuencia de Corte	1	0.78	0.66	0.85	-0.11	0.27	0.37	0.83	-0.38	-0.91	-0.29	0.29
Rendimiento MS	0.78	1	0.43	0.58	-0.10	0.33	0.15	0.55	-0.04	-0.63	-0.17	0.15
Holocelulosa	0.66	0.43	1	0.75	0.51	-0.36	0.57	0.73	-0.53	-0.79	-0.35	0.36
Celulosa	0.85	0.58	0.75	1	-0.16	0.08	0.35	0.77	-0.61	-0.87	-0.31	0.47
Hemicelulosa	-0.11	-0.1	0.51	-0.16	1	-0.65	0.41	0.09	0.0	-0.0	-0.13	-0.0
Lignina	0.27	0.33	-0.36	0.08	-0.65	1	-0.25	-0.0	0.07	-0.0	0.20	0.24
Extractivos	0.37	0.15	0.57	0.35	0.41	-0.25	1	0.60	-0.38	-0.47	-0.53	0.21
Volátiles	0.83	0.55	0.73	0.77	0.09	-0.0	0.60	1	-0.52	-0.86	-0.69	0.20
Humedad	-0.38	-0.04	-0.53	-0.61	0.0	0.07	-0.38	-0.52	1	0.52	0.26	-0.37
Cenizas	-0.91	-0.63	-0.79	-0.87	-0.0	-0.0	-0.47	-0.86	0.52	1	0.24	-0.36
C. fijo	-0.29	-0.17	-0.35	-0.31	-0.13	0.20	-0.53	-0.69	0.26	0.24	1	0.13
P. calorífico	0.29	0.15	0.36	0.47	-0.0	0.24	0.21	0.20	-0.37	-0.36	0.13	1

Valores en negritas, muestran correlación entre las variables con $p > 0.01$

3.5 CONCLUSIONES

La frecuencia de corte causa variaciones en el rendimiento de biomasa, análisis inmediato y composición química de la biomasa.

El menor contenido de extractivos se cuantificó a los 90 días de corte con 7.7 %. El mayor porcentaje de celulosa de 44.1 %, determinado a los 150 días de corte. El máximo contenido de hemicelulosas fue 30 %, a los 30 y 60 días de corte. El menor porcentaje de lignina de 16.2 %, a los 60 días de corte. La menor cantidad de proteína de 2.4 %, a los 150 días.

Se determinó como máximo 9 % de ceniza a los 30 días de corte. En la frecuencia de corte a los 150 y 180 días, se obtuvieron los mayores porcentajes de materia volátil y carbono fijo con 78.4 y 16.3 %, respectivamente.

La frecuencia de corte a los 180 días, acumuló la mayor producción de biomasa seca con $27.95 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$; el mayor porcentaje de holocelulosa con 73.6 %; el mayor rendimiento de bioetanol por unidad de biomasa con $281.3 \text{ L t MS}^{-1}$, y el mayor rendimiento de bioetanol por unidad de superficie con $7865 \text{ L ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

El poder calorífico no mostró variación estadística entre frecuencias de corte, los valores energéticos fueron de 16.33 a 16.72 MJ kg^{-1} .

En general, la composición química comprende contenidos de celulosa de 38.4 a 44.1 %; hemicelulosa de 26.7 a 30.1%; lignina de 16.2 a 19.5 %; extractivos de 7.7 a 11.8 % y proteína de 2.4 a 8.2 %. En el análisis inmediato se obtuvieron valores de 5.2 a 9 % para cenizas; 73.6 a 78.4 % para materia volátil; 5.2 a 9 % para cenizas, y 7.1 a 8.1 % para humedad.

El rendimiento teórico de bioetanol por unidad de biomasa comprende valores de 262.6 a $281.3 \text{ L t MS}^{-1}$. Por su parte, el rendimiento anual de bioetanol varía de 2935.6 a $7865.1 \text{ L ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

3.6 LITERATURA CITADA

Alves do Santos, E., D.S. Silva, y J.L. Queiroz-Filho. 2001. Composición química de *Pennisetum purpureum* Schum. Cv. Roxo cortado a diferentes alturas. Revista Brasileira de Zootecnia. 30: 12-22.

American Society for Testing and Materials (ASTM). 1977. Method of Test for Alpha-Cellulose in Wood ASTM D1103 – 60. Annual book of ASTM standards. Part 22: Wood; Adhesives. Pennsylvania: ASTM. pp: 343-345.

Ando, S., I. Arai, K. Kiyoto, and S. Hanai. 1986. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation Technology. 64:567.

Arias, A. y H. Hernández. 2002. Composición química del pasto aguja (*Brachiaria humidicola*) sometida a pastoreo en una finca del municipio Guanare estado portuguesa. Revista Científica. 12: 562-565.

Aristidou, A. and M. Penttila. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. Current Opinion in Biotechnology. 11: 187-198.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Método semi-micro Kjeldahl. Official Methods of Analysis. 15th ed. Arlington. VA, U.S.A. pp: 44-65.

Atchison, J.E. and J.N. McGovern. 1983. History of paper and the importance of non-wood plant fibers. *In*: Secondary fibers and non-wood pulping. Hamilton F, Leopold B, Tech (eds.) Pulp and Paper Manufacture, 3rd. Ed. Joint Textbook Committee of the Paper Industry Atlanta, USA. pp: 1-3.

Balat, M., H. Balat and S. Oz. 2008. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science. 34: 551–573.

Basile De Castro, F. 1994. The Use Of Steam Treatment To Upgrade Lignocellulosic Materials For Animal Feed. Master of Science Thesis. University of São Paulo. 56 p.

Basu, P. 2010. Biomass Gasification and Pyrolysis. Practical Design and Theory. 2nd Ed. Elsevier Inc, Amsterdam. 44 p.

Betts, W.B., R.K. Dart, A.S. Ball and S.L. Pedlar. 1991. Biosynthesis and Structure of lignocellulose. *In*: W. B. Betts (ed) Biodegradation: Natural and Synthetic Materials. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp: 139-155.

Bidlack, J., M. Malone, and R. Benson. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science. 71: 51-56.

Brosse, N., A. Dufour, X. Meng, Q. Sun and Ragauskas. 2012. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 6: 580–598.

Buranov, A.U., and G. Mazza. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. Industrial Crops and Products. 28:237-259.

Cab, F.E.J., Q.J.F, Enríquez, P.J. Pérez, G.A. Hernández, H.J.C. Herrera, J.E. Ortega y C.A.R. Quero. 2007. Potencial productivo de tres especies de *Brachiaria* en monocultivo y asociadas con *Arachis pintoi* en Isla, Veracruz. Técnica Pecuaria. México. 46(3):317-332.

Canilha, L., V.T.O. Santos, G.J.M. Rocha, A.E. Silva, J.B.M. Giulietti, and S.S. Silva. 2010. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 38: 1467–1475.

Cardona, M.E., A.L. Ríos, y D.J. Peña. 2013. Disponibilidad de variedades de pastos y forrajes como potenciales materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol en Colombia. Información Tecnológica. 23(6): 87-96. En el texto aparece con año 2013, pag 54.

Castaño, P.H.I. 2008. La yuca como alternativa para la producción de alcohol carburante. Revista Politécnica. 6: 25-38.

Chacón-Hernández, P.A. y Vargas-Rodríguez, C.F. 2009. Digestibilidad y calidad del *Pennisetum purpureum* cv. King grass a tres edades de rebrote. *Agronomía Mesoamericana*. 20(2): 399-408.

Chen, F. and R.A. Dixon. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*. 25: 759-761.

Coll, L.C. 2008. La utilización de los residuos frutícolas para obtener bioetanol de Segunda Generación. *Jornadas Técnicas de Frutas y Hortalizas*. Palma de Mallorca-España. Consultado el 07 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/02378.pdf>.

Demirbas, A. 2004. Ethanol from cellulosic biomass resources. *International Journal of Green Energy*. 1: 79-87.

Enríquez, Q.J.F., Romero, M.J. 1999. Tasa de crecimiento estacional a diferentes edades de rebrote de 16 ecotipos de *Brachiaria* spp. en Isla, Veracruz. *Agrociencia*. 33(2): 141-148.

Fenske, J.J., D.A. Griffin y M.H. Penner. 1998. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. *The Journal of Industrial Microbiology*. 20:364.

García, E. 1988. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)* 4ª ed. Instituto de Geografía, UNAM; México. 217p.

Forero, O. 2009. El bagazo de caña de azúcar, petróleo verde del siglo. Consultado el 8 de octubre de 2014. Disponible en: WWW.URL.http://www.dinero.com/seccion-patrocinios/green/bagazo-cana-azucar-petroleo-verde-del-siglo_62876.aspx

Godin, B., S. Lamaudiere, R. Agneessens, T. Schmit, J.P. Goffart, D. Stilmant, P.A. Gerin, and J. Delcarte. 2013. Chemical characteristics and biofuels potentials of various plant biomasses: influence of the harvesting date. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93: 3216–3224.

Goldstein, I. S. 1991. Overview of the chemical composition of wood. *In*: Lewin, M. & Goldstein, I. S. (eds.) Wood Structure and Composition. International Fiber Science and Technology. 2: 121-126.

Gregg, D.J, A. Boussaid, and J.N. Saddler. 1998. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: Effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. *Bioresource Technology*. 63: 7-12.

Hayes, J. Daniel. 2011. Analysis of Lignocellulosic Feedstocks for Biorefineries with a Focus on The Development of Near Infrared Spectroscopy as a Primary Analytical Tool. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Limerick. Ireland. pp: 30-55.

Hodgson, E. M., S. J. Lister, A.V. Bridgwater, J. Clifton-Brown, and I.S. Donnison. 2010. Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of *Miscanthus* in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass Bioenergy*. 34: 652–660.

Kazi, F.K., J.A. Fortman, R. Anex, D.D. Hsu, and A. Dutta, G. Kothandaraman. 2010. Techno-Economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel*. 89: 20-28.

Kollmann, F. 1959. Tecnología de la madera y sus aplicaciones. Madrid, España: Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias y Servicio de la Madera. 675 p.

Kosaric, N. 2011. Microbiology and Biochemistry of Ethanol Formation. *In*: The Biotechnology of ethanol: Clasical and future applications, Eds. WILEY-VCH. London. 103–105.

Laser, M. E. Larson, B. Dale, M. Wang, N. Greene, and L.R. Lynd. 2009. Comparative analysis of efficiency, environmental impact, and process economics for mature biomass refining scenarios. *Biofuels, Bioproducts, & Biorefining*. 3: 247-270.

Lee, J.M., J.R.A. Shi and Venditti H. J. 2009. Autohydrolysis pretreatment of coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. *Bioresource Technology*. 100(24): 6434–6441.

Lawford, H.G., J.D. Rousseau, A. Mohagheghi, and J.D. McMillan. 1999. Fermentation performance characteristics of a prehydrolyzate-adapted xylose-fermenting recombinant *Zymomonas* in batch and continuous fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 77: 191-204.

Lee, J.M., J. Shi, R.A., and Venditti H.J. 2009. Autohydrolysis pretreatment of coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. *Bioresource Technology*. 100(24): 6434–6441.

Lewandowski, I. and A. Kicherer. 1997. Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthusxgiganteus*. *European Journal of Agronomy*. 6:163–177.

Lewandowski, I., J.C. Clifton-Brown, B. Andersson, G. Basch, D.G. Christian, U. Jorgensen, M. B. Jones, A. B. Riche, K. U. Schwarz, K. Tayebi, and F. Teixeira. 2003. Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* Genotypes. *Agronomy Journal*. 95(5): 1274-1280.

Li, X., E. Ximenes Kim, M. Slininger, R. Meilan, M. Ladisch, and C. Chapple. 2010. Lignin monomer composition affects Arabidopsis cell-wall degradability after liquid hot wáter pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 3: 27-65.

Mari, L.J., L.G. Nussio, y P. Schmidt. 2004. Magnitud de las alteraciones en la composición morfológica y el valor nutritivo de hierba Mandu mantenida a intervalos fijos entre cortes. Reunión de la Sociedad Brasileira de Zootecnia. SBZ. Campo Grande. Brasil. pp: 41-72.

Mateus, L., O. Hernández, M. Velásquez, y J.J. Díaz. 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Revista Colombiana de Biotecnología*. XIV: 146-156.

McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technol*. 83: 37-46.

Murnen, H. K., V. Balan, S.P.S. Chundawat, B. Bals, L.D.C. Sousa, and B.E. Dale. 2007. Optimization of ammonia fiber expansion (afex) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to fermentable sugars. *Biotechnology Progress*. 23: 846-850.

Oak Ridge National Laboratory. 2006. Bioenergy conversion factors. Consultado el 08 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.localenergy.org/pdfs/Document%20Library/Bioenergy%20conversion%20factors.pdf>.

Olanders, B., B.M. Steenari. 1995. Characterization of ashes from wood and straw. *Biomass and Bioenergy*. 8: 105-115.

Parrish, D.J. and J.H. Fike. 2005. The biology and agronomy of switchgrass for biofuels. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24: 423–459.

Piccolo, C. and F. Bezzo. 2009. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biomass and Bioenergy*. 33: 478-491.

Ramírez, J, D. Verdecia y I. Leonard. 2008. Rendimiento y caracterización química del *Pennisetum* Cuba CT 169 en un suelo pluvisol. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 9(5). Consultado el 20 de diciembre de 2015. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050508/050806.pdf>

Rincon, A.C., M.G.A. Ligarreto y E. Garay. 2008. Producción de forraje en los pastos *Brachiaria decumbens* cv. Amargo y *Brachiaria brizantha* cv. Toledo, sometidos a tres frecuencias y a dos intensidades de defoliación en condiciones del piedemonte llanero colombiano. *Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*. 61(1): 4336-4346.

Robinson, J., J.D. Keating, A. Boussaid, S.D. Mansfield and J.N. Saddler. 2002. The influence of bark on the fermentation of Douglas-fir whitewood pre-hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 421-443.

Roger, Q.L.M., A.N. Souza, H. Soares. 2011. Custo de produção das biomassas de

eucalipto e capim-elefante para energia. *Cerne, Lavras.* 3(17): 417-426.

Rowell, R. M., R. Pettersen, J. S. Han, J. S. Rowell y M. A. Tshabalala. 2005. Cell Wall Chemistry. *In: Rowell, R. M. (ed.) Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites.* CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp: 35-74.

Sanderson, M. A., J.C. Read and R.L. Reed. 1999. Harvest management of switchgrass for biomass feedstock and forage production. *Agronomy Journal.* 91: 5–10.

Sarath, G., D. Akin, R. Mitchell, y K. Vogel. 2008. Cell-wall composition and accessibility to hydrolytic enzymes is differentially altered in divergently bred switchgrass (*Panicum virgatum* L.) genotypes. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 50(1):1-14.

Statistical Analysis System (SAS). 2002. Software (V.9.0). User's Guide. N. C., USA. 315 p.

Sendich, E.N., M. Laser, S. Kim, H. Alizadeh, L. Laureano-Perez, B. Dale, and L. Lynd. 2008. Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX) process and resulting reductions in minimum ethanol selling price. *Bioresource Technology.* 99: 8429-8435.

Sjöström, E. 1981. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications.* 2nd Edition. Academic Press. San Diego, U.S.A. pp: 68-82.

Subero Pérez, Elena. 2010. Caracterización de los combustibles sólidos. Proyecto de Tesis de Ingeniero Técnico Industrial. Universidad de Zaragoza, España. 12p.

Sues, A., R. Millati, and L. Edebo. 2005. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Research.* 5: 669-676.

Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review. *Bioresource Technology.* 83: 1-11.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2006-2007. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T 222 om-02. TAPPI Test Methods. Fibrous Materials

and Pulp Testing. CD Version, Atlanta, GA. U.S.A. pp: 68-78.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2006-2007. Preparation of wood for chemical analysis. T 264 cm-97. TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing. CD Version, Atlanta, GA. U.S.A. pp: 66-82.

Thomason, W.E., W.R. Raun, and G.V. Johnson. 2004. Switchgrass response to harvest frequency and time and rate of applied nitrogen. *Journal of Plant Nutrition*. 27: 1199–1226.

Vamvuka, D., E. Kakaras, E. Kastanaki, and P. Grammelis. 2003. Pyrolysis characteristics and kinetics of biomass residuals mixtures with lignite. *Fuel*. 82: 1949-1960.

Wayman, M. and M.G.S. Chua. 1979. Characterization of autohydrolysis aspen (*P. tremuloides*) lignins. Part 4: Residual autohydrolysis lignin. *Canadian Journal of Chemistry*. 57: 2612-2616.

Weiler, E.W. 2004. Fisiología del metabolismo. *In: Sitte, P., E. W. Weiler, J. W. Kadereit, A. Bresinsky and C. K. Strasburger (eds.). Tratado de Botánica*. 35^a Ed. Ed. Omega. España. pp: 223-359.

Wiselogel, A. E., F. A. Agblevor, D.K. Johnson, S. Deutch, J.A. Fennell, and M.A. Sanderson. 1996. Compositional changes during storage of large round switchgrass bales. *Bioresource Technology*. 56: 103-109.

Wilson, D.B. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125: 289–297.

Xu, J., J.J. Cheng, R.R., Sharma-Shivappa, and J.C. Burns. 2010. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresource Technology*. 101.8: 2900–2903.

Yin, C-Y. 2011. Prediction of higher heating values of biomass from proximate and ultimate analyses. *Fuel*. 90 (3): 1128-1132.

Zhang, T., C. Wyman, K. Jakob, and B. Yang. 2012. Rapid selection and identification of Miscanthus genotypes with enhanced glucan and xylan yields from hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*. 5(1):56-70.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

La biomasa lignocelulósica de *Urochloa brizantha* (CIAT 26110) cv. Toledo como materia prima para la producción de bioetanol, presenta una multiplicidad de factores que determinan su potencial productivo, se encontraron diversos puntos clave: a) La frecuencia de corte influye sobre la composición química y rendimiento de materia seca; b) A mayor madurez de planta, los contenidos de celulosa, hemicelulosa, lignina y extractivos se incrementan; c) La cantidad de proteína y cenizas, así como el porcentaje de materia volátil, tienden a disminuir a medida que la frecuencia de corte es mayor; d) Los porcentajes de carbono fijo y humedad son mayores cuando el pasto es cortado a edades tempranas, y e) La frecuencia de corte no modifica el poder calorífico.

La producción anual de energía depende de la producción de biomasa seca, por lo cual, las frecuencias de corte con mayores rendimientos de biomasa producen mayor cantidad de energía por unidad de superficie.

El mayor rendimiento teórico de bioetanol se obtuvo con mayores contenidos de celulosa y hemicelulosa.

La producción de bioetanol por unidad de superficie, depende del rendimiento de biomasa anual.

El rendimiento teórico de bioetanol y las características químicas de la biomasa, convierten a *Urochloa brizantha* (CIAT 26110) cv. Toledo en una alternativa potencial para la obtención de bioetanol en áreas tropicales.

Con base en el rendimiento de biomasa, composición química, análisis inmediato y producción teórica de bioetanol, es recomendable evaluar a *Urochloa brizantha* (CIAT 26110) cv. Toledo en los procesos de pre-tratamiento, hidrólisis y fermentación, con la finalidad de elaborar un diagnóstico completo sobre su potencial como materia prima para la obtención de bioetanol.