

**UNAM**  
**POSGRADO**  
Ciencia e Ingeniería de  
Materiales



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

.....  
**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA COMPOSICIONAL DE  
CUATRO VARIEDADES DE GUADUA ANGUSTIFOLIA  
KUNTH Y SU CORRELACIÓN CON LAS PROPIEDADES  
MECÁNICAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIA  
E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

I.F. LUZ ADRIANA SÁNCHEZ ECHEVERRI

Tutor: Dr. Mario E. Rodríguez García

México, DF



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Bajo todas las circunstancias este capítulo debe ser el más extenso en este trabajo.

En toda la experiencia Universitaria y la conclusión de esta etapa, ha habido personas que merecen agradecimiento porque sin su valioso aporte no hubiera sido posible este trabajo y también hay quienes las merecen por haber plasmado una huella en mi camino.

A mi familia, en especial mis padres Dario y Judith, a quienes agradezco de todo corazón por su comprensión, apoyo incondicional, guía, enseñanzas amor y cariño. En todo momento los llevo en el corazón.

A mi hermana, Ana María, por el apoyo que me brinda, sé que puedo contar con ella en todo momento así nos encontremos distantes físicamente.

A Dios por brindarme las oportunidades de la vida, a mis amigos y mi novio por su apoyo, confianza y lealtad.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada por haberme recibido durante el curso de mi maestría, por su apoyo y servicio desinteresado. A la maestra Alicia del Real López por el servicio prestado en la toma de imágenes de microscopía electrónica de barrido. A CONACYT por el financiamiento de mis estudios.

A mi tutor Mario Enrique Rodríguez, por su apoyo, dedicación y enseñanzas.

A cada uno de mis sinodales por su dedicación para la revisión y corrección de mi trabajo por sus aportes y sugerencias muchas gracias.

## Resumen

La *Guadua angustifolia* Kunth es una especie de bambú que se puede encontrar en diferentes países de centro y Sur América sobresaliendo por las propiedades mecánicas y como opción para reemplazar al concreto. Existen diferentes variedades de ésta; y si bien se han observados sus características y aplicaciones, aún no se tiene un estudio detallado de su composición química y como ésta se puede relacionar con sus propiedades mecánicas. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis completo de la composición química de cuatro variedades de *Guadua angustifolia* Kunth y relacionarlo con la respuesta mecánica.

Métodos NREL 510 fueron utilizados para la determinación de la composición química, el método 985.29 AOAC fue usado para determinar el contenido de fibra soluble e insoluble, las técnicas de difracción de Rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM) se usaron para determinar la morfología y estructura cristalina de las cuatro variedades de *Guadua*. Finalmente, se obtuvo el módulo de Young y módulo de ruptura (MOR), en una máquina universal INSTROM 4401. Una correlación entre la composición y el comportamiento mecánico se definió por medio del coeficiente de correlación de *Pearson* el cual se obtuvo con el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1.

La composición química de las cuatro variedades de *Guadua*, muestra que este material se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina indicando que el mayor componente de la *Guadua* es fibra y que el porcentaje más alto es de fibra insoluble. Las fibras presentes dentro de los culmos de bambú poseen estructura cristalina y su orientación no es la misma en todas las direcciones. Además, se encontró que el comportamiento mecánico decrece con la edad del culmo. La correlación entre los valores del módulo de Young y módulo de ruptura (MOR) con el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y contenido de fibra mostró que la fibra insoluble influye en el comportamiento mecánico.

**Palabras Claves:** *Guadua Angustifolia*, Fibra, Composición Química, Pruebas mecánicas.

## Abstract

Guadua Angustifolia Kunth is a bamboo specie whose growth is mainly in a Central and South America regions. It kind of bamboo highlight due its mechanical properties and it can be seen as an option to replace the concrete structures. There are many Guadua varieties and in some countries have seen its characteristics and applications, but do not have a detail study about its chemical composition correlated with mechanical behavior. The objective in this work was realize a complete chemical composition analysis in four varieties and correlate them with the mechanical behavior.

For chemical composition analysis NREL methods were used, the 985.29 AOAC method was used in order to determine the soluble and insoluble fiber content. On the other hand, X-ray diffraction (XRD) and Scanning electronic microscopy (SEM) techniques were used to determine the morphology and crystalline structure in the

four Guadua varieties. Finally, Young modulus and modulus of rupture (MOR) were obtained in a universal machine INSTRON 4401. A correlation was obtained between chemical composition and mechanical behavior through a statistical software STATGRAPHICS Plus 5.1.

The chemical composition shows that the Guadua is constituted by cellulose, hemicellulose and ligning so the main compound is the insoluble fiber. The X-ray analysis shows that the Guadua fiber has a crystalline orientation, and the orientation varies with the direction analyzed. The mechanical behavior decreases with the culm age.

The correlation between mechanical behavior and chemical composition, shows that the insoluble fiber affects the mechanical properties.

**Key words:** Guadua Angustifolia Kunth; Fiber; Chemical composition; Mechanical properties.

# Índice general

<b>Contenido</b>	<b>Pag.</b>
<b>1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Glosario .....	1
1.2 Introducción.....	4
1.3 Antecedentes.....	7
1.4 Justificación.....	12
1.5 Hipótesis.....	12
1.6 Objetivo .....	13
<b>2 Marco teórico .....</b>	<b>15</b>
2.1 Generalidades del bambú .....	15
2.1.1 Guadua.....	17
2.2 Guadua Angustifolia Kunth (GAK) .....	18
2.2.1 Fases de desarrollo de la Guadua .....	20
2.2.2 Partes de la Guadua Angustifolia Kunth .....	21
2.2.3 Variedades de Guadua Angustifolia Kunth .....	24
2.2.4 Ventajas de la Guadua Angustifolia kunth .....	25
2.3 Composición Química de la Guadua .....	27
2.3.1 Fibra en el bambú.....	29
2.4 Propiedades Mecánicas del bambú .....	40
2.4.1 Ensayos de compresión.....	41
2.4.2 Ensayos de Flexión .....	42
<b>3 Materiales y Métodos .....</b>	<b>44</b>
3.1 Descripción de las muestras .....	44
3.1.1 Obtención de las muestras.....	44
3.1.2 Descripción de las muestras.....	44
3.1.3 Preparación de las muestras .....	45
3.2 Caracterización química .....	45
3.2.1 Determinación de extractivos .....	46
3.2.2 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina .....	51
3.2.3 Contenido de cenizas .....	58
3.2.4 Contenido de Fibra .....	60
3.2.5 Contenido de Humedad.....	64
3.3 Caracterización Física .....	66
3.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido .....	66
3.3.2 Difracción de Rayos-X.....	68
3.3.3 Propiedades Mecánicas .....	71
3.4 Correlación de Resultados .....	74
3.5 Distribución de Fibra a través del Culmo .....	75

<b>4</b>	<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>77</b>
4.1	Descripción de las muestras .....	77
4.2	Caracterización Química.....	77
4.2.1	Determinación de extractivos .....	77
4.2.2	Determinación de carbohidratos y lignina.....	78
4.2.3	Contenido de Cenizas.....	80
4.2.4	Contenido de Fibra .....	82
4.2.5	Contenido de Humedad.....	84
4.3	Caracterización Física .....	84
4.3.1	Microscopía Electrónica de Barrido SEM .....	85
4.3.2	Difracción de Rayos-X.....	89
4.3.3	Propiedades Mecánicas .....	91
4.4	Correlación de Resultados .....	95
4.5	Distribución y Morfología a ravés del Culmo .....	99
4.6	Conclusiones.....	105

<b>Índice de Figuras</b>	<b>Pag.</b>
1-1 Diferentes usos de la Guadua Angustifolia Kunth.....	7
1-2 Cemento reforzado con fibras a) fibra de vidrio, b) fibra de acero.....	11
2-1 Direcciones de la madera y el bambú .....	16
2-2 Tallo de guadua angustifolia Kunth.....	18
2-3 Fases del desarrollo de la guadua angustifolia Kunth .....	20
2-4 Partes de la Guadua angustifolia Kunth y sus principales aplicaciones...	22
2-5 Esquema de los componentes del bambú .....	28
2-6 Cadenas de Celulosa con enlaces intermoleculares en el mismo plano y en planos superiores e inferiores .....	31
2-7 Representación esquemática de las moléculas de hemicelulosa mas comunes en la madera. ....	33-34
2-8 Molécula de lignina.....	35
2-9 Molécula lineal de Amilosa .....	37
2-10 Estructura helicoidal de molécula de amilosa .....	38
2-11 Molécula de amilopectina.....	39
2-12 Ensayos de compresión perpendicular a la fibra y ensayo de compresión paralelo a la fibra.....	42
2-13 Ensayo de flexión en tres puntos (a) cuatro puntos (b).....	43
3-1 Tamizador (FRITSCH ANALYSETTE 3 PRO) utilizado en la preparación de los especímenes para los análisis químicos .....	47
3-2 Montaje para la extracción de Agua y Alcohol.....	49
3-3 Esquema para la extracción en Agua.....	49
3-4 Esquema para la extracción en Alcohol .....	50
3-5 Esquema resumido de la hidrólisis para la determinación de Carbohidratos estructurales y lignina.....	52
3-6 Espectrofotómetro utilizado en la determinación de lignina.....	53



3-7 HPLC utilizado en la determinación de carbohidratos estructurales .....	58
3-8 Diagrama de bloques para la determinación de cenizas .....	60
3-9 Culmo de Guadua angustifolia Kunth utilizados en la determinación de fibra soluble e insoluble a) Esquema de un culmo completo de la sección basal de la Guadua, se puede observar el diámetro interno y externo de este b) Sección obtenida del culmo de Guadua, en el cual se encuentran identificadas las principales direcciones de esta. ....	61
3-10 Diagrama de bloques para la determinación de fibras .....	63
3-11 Diagrama de bloques para la determinación de humedad. ....	65
3-12 Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6060LV .....	68
3-13 Desviación producida por la difracción, el cambio de fase de las ondas produce interferencia constructiva (izquierda) o destructiva (derecha) ....	69
3-14 (a) Probetas prueba compresión (b). Probetas prueba flexión.....	72
3-15 Máquina universal INSTRON 4401 .....	73
3-16 Secciones del culmo de Guadua Angustifolia Kunth R1 parte interna R4 parte externa .....	76
4-1 Micrografías de culmos de Guadua angustifolia Kunth a) Micrografía en 3D, b) Vista transversal del culmo de Guadua angustifolia Kunth, c) Acercamiento de la vista transversal de la Guadua Angustifolia Kunth donde se aprecia los haces vasculares rodeados del tejido que contiene la fibra. ....	85-86
4-2 Micrografías secuenciales de las sección transversal del culmo de Guadua angustifolia Kunth variedad Rayada Amarilla culmo joven.....	88
4-3 Estructuras anatómicas presentes en la Guadua angustifolia Kunth todas pertenecientes a cortes longitudinales. a), b) y d) Protoxilema con anillos de soporte a diferentes magnificaciones, c) Tejido parénquima. ...	89
4-4 Difractogramas de cuatro variedades de Guadua angustifolia Kunth en dirección axial y transversal. ....	90
4-5 Respuesta a la compresión de la Guadua Angustifolia Kunth Cebolla (izquierda) Rayada Amarilla (derecha) .....	92
4-6 Curva obtenida en ensayo de flexión. a) curva teórica para aceros. b) curva obtenida en los ensayos realizados en Guadua angustifolia Kunth variedad cebolla joven. ....	94

4-7	Correlación entre % de Fibra soluble y módulo de elasticidad en culmos jóvenes de <i>Guadua angustifolia kunth</i> .....	97
4-8	Correlación entre % de Fibra soluble y modulo de elasticidad en culmos jóvenes de <i>Guadua angustifolia kunth</i> .....	97
4-9	Correlación entre % de hemicelulosa y modulo de tensión en culmos maduros de <i>Guadua angustifolia kunth</i> .....	98
4-10	Variación en el porcentaje de Fibra insoluble a través del culmo de GAK.....	99
4-11	Micrográficas SEM 50X para R1, R2, R3 y R4 en GAK variedad macana (a,b,c,d) y variedad Rayada Amarilla (e,f,g,h).....	101
4-12	Variación de células parenquimas a través del culmo secciones R2, R3 y R4. (a,b,c) variedad Macana y (d,e,f) variedad rayada amarilla .....	102
4-13	Almidón presente en culmos de GAK (a,b) variedad Macana (c,d) variedad Rayada Amarilla.....	103
4-14	Difractogramas de cuatro secciones de GAK a) variedad Rayada Amarilla, b) Variedad Macana.....	104

<b>Índice de Tablas</b>	<b>Pag.</b>
1.1 Usos del bambú como Planta .....	5
1.2 Clasificación Taxonómica de la Guadua Angustifolia Kunth .....	8
1.3 Composición química del bambú.....	9
2.1 Generalidades de la Guadua angustifolia Kunth .....	19
2.2 Longitudes de algunas fibras de bambú .....	30
3.1 Longitudes y absorbancias para estándar NIST 8491 .....	56
4.1 Porcentaje de Extractivos en alcohol y porcentajes de sacarosa en cada uno de los cuatro espécimen analizados y su variación. ....	78
4.2 Contenido de lignina en las cuatro variedades de Guadua Angustifolia Kunth en culmos jóvenes y maduros.....	78
4.3 Contenido de hemicelulosa y celulosa en las cuatro variedades de Guadua angustifolia Kunth en culmos jóvenes y maduros .....	79
4.4 Porcentaje de Cenizas presentes en culmos jóvenes y maduros de Guadua angustifolia Kunth.....	81
4.5 Contenido de fibra soluble e insoluble en las cuatro variedades de Guadua angustifolia Kunth analizadas .....	82
4.6 Análisis composicional de Guadua Angustifolia Kunth.....	83
4.7 Contenido de sólidos totales para Guaduas Jóvenes y maduras de las variedades estudiadas .....	84
4.8 Áreas de las secciones transversales de culmos de Guadua angustifolia Kunth en especímenes jóvenes y maduros.....	92
4.9 Módulos de elasticidad para Guadua angustifolia Kunth en culmos Joven y maduros.....	93
4.10 Módulo de ruptura (MOR) para diferentes culmos de GAK.....	94
4.11 Coeficientes de correlaciones de Pearson entre las variables analizadas. ....	96

---

# Capítulo 1

## 1 INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Glosario

- **Almidón:** Sustancia alimenticia de almacenamiento de las plantas.
- **Angiospermas:** Plantas con flores. Originadas hace unos 110 millones de años de un antecesor desconocido hoy dominan la mayor parte de la flora mundial.
- **Anisotropía:** Cualidad de un medio, generalmente cristalino, en el que alguna propiedad física depende de la dirección de un agente.
- **AOAC:** Association of Official Agricultural Chemists. Asociación que establece los métodos para métodos analíticos de medición.
- **Apical:** Perteneciente o relativo a un ápice o punta, o localizado en ellos.
- **ASTM:** American Society for Testing Materials. Organismo de normalización de los Estados Unidos de América, esta encargada de la definición de pruebas para diversos materiales.
- **Celulosa:** Homopolisacárido. Hidrato de carbono, principal componente de la membrana de las células vegetales. Se utiliza en la fabricación de papel, fibras textiles, plásticos entre otros.
- **Cepa - Basa:** Parte inferior del culmo de bambú.

- **Culmo:** Eje aéreo segmentado que emerge del rizoma. Este término se emplea principalmente cuando se hace referencia a los bambúes leñosos. El culmo consta de: cuello, nudos y entrenudos. Se le denomina cuello a la parte de unión entre el rizoma y el culmo, nudo a los puntos de unión a los cañutos; y entrenudo a la porción del culmo comprendida entre dos nudos.
- **Dirección axial:** Dirección de crecimiento de la planta.
- **Dirección radial:** Dirección que abarca desde la pared interna hasta la pared externa.
- **Esclerenquima:** Tipo de tejido sostén con células de paredes celulares gruesas, frecuentemente lignificado.
- **Espectrofotómetro:** Aparato que mide la cantidad de luz absorbida por una sustancia en disolución y compara intensidades espectrales con respecto a una longitud de onda.
- **Gimnospermas:** Plantas con semillas desnudas; las primeras plantas con semillas.
- **Gramínea:** Familia de plantas angiospermas de tallo cilíndrico, nudoso y generalmente hueco.
- **Guadua:** Especie de bambú muy grueso y alto, con púas y canutas de medio metro.
- **Haces vasculares:** Grupo de células pertenecientes al xilema, floema y al cámbium en el culmo de las plantas.
- **Hemicelulosa:** Heteropolisacárido compuesto por más de un tipo de monómero.

- **HPLC:** High Pressure Liquid Chromatography. Técnica que permite aislar, separar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos.
- **Lignina:** Polímero que se encuentra incrustado en la pared celular secundaria de las células de las plantas leñosas. Ayuda a robustecer y endurecer las paredes.
- **Material compuesto:** Sistema o combinación de materiales constituido a partir de una unión (no química, insolubles entre sí) de dos o más componentes, que da lugar a un nuevo material con propiedades específicas que no son propias de los materiales que lo constituyen.
- **Ornamental:** Pertenece o relativo a la ornamentación o adorno.
- **Parénquima:** Tejido fundamental constituido por células vivas que cumplen diferentes funciones.
- **Ro tap:** Equipo agitador de mallas.
- **SEM:** Microscopia de barrido electrónico. Técnica de caracterización utilizada para establecer morfología.
- **XRD:** Difracción de Rayos-X. Técnica de caracterización utilizada para la identificación de estructuras cristalinas y orientaciones cristalográficas de las mismas.

## 1.2 Introducción

Botánicamente el bambú se encuentra clasificado como *Bambusea* una de las tribus de la familia de las *Gramíneas* o *Poáceas* (nombre científico), las cuales forman una familia de plantas con aspecto de pastos gigantes y reconocida como una de las más antiguas y extensas existentes en la tierra. De acuerdo al sistema de clasificación APG II (*Angiosperm Phylogeny Group*), pueden existir más de 800 especies y están presentes en todas las latitudes exceptuando Europa que no tiene especies nativas. El género *Guadua*, constituye uno de los bambúes más importantes de América Latina, en donde se encuentran aproximadamente 25 especies nativas distribuidas desde el Norte de México hasta Argentina y pueden ser encontradas en diferentes altitudes alrededor de los 2000 metros sobre el nivel del mar. El género *Guadua* cuenta con diferentes especies dentro de la que se encuentra la *Guadua angustifolia* Kunth (*GAK*) nativa de las regiones tropicales en Centro y Sur América y que generalmente crece a lo largo de las riveras de los ríos en guaduales puros o combinados con otros árboles (Kleinn y Morales-Hidalgo, 2006). Se han establecido diferentes variaciones de la especie *GAK* denominadas “formas” o “tipo”, dentro de las cuales se ubican las estudiadas en esta tesis y conocidas como “macana”, “cebolla”, “castilla” y “Rayada amarilla”. En los últimos años se ha incrementado el número de tierras usadas en el cultivo de guaduales que después son utilizados para diversos propósitos. Estructuralmente esta planta esta constituida por un sistema de ejes vegetativos los cuales presentan diferencias en el rizoma, el tallo y las ramas (Díaz, 2003).

El rizoma no solo sirve como anclaje y apoyo radicular de la planta, sino que almacena nutrientes que son distribuidos a lo largo de ella, puede llegar a medir entre un 1 m. y 1.5 m con un espesor de 5 mm; su tallo aéreo es de forma cilíndrica y en la mayoría de los bambúes incluida la *Guadua angustifolia* Kunth es hueco, se encuentra separado transversalmente por

nudos que le dan mayor rigidez, flexibilidad y resistencia. El diámetro varía según la especie.

El bambú y por ende la *Guadua* es considerada una de las plantas más útiles del mundo, la cual puede suplir las necesidades básicas del hombre como alimentación, vestido, vivienda entre otras. El bambú tiene una larga historia asociada con la humanidad, es el material más antiguo usado en la construcción. De acuerdo a la calidad de su culmo éste tiene diferentes aplicaciones (Londoño, 2002), las cuales van desde la preservación de suelos, si es vista como una planta, hasta componente en la construcción, si es vista como un material. La Tabla 1.1 se muestra con detalle la utilización de esta planta.

**Tabla 1.1 Usos del bambú como planta**

<b><i>Bambú como planta</i></b>	<b><i>Bambú como material</i></b>
<p><b><i>Horticultural Ornamental</i></b></p> <p><b><i>Ecología</i></b> Estabilización de suelos Usos sobre laderas Setos y pantallas Uso en tierras pequeñas</p> <p><b><i>Agroforestal</i></b> Plantaciones Sembrados naturales Mezcla de sistemas agroforestales</p>	<p><b><i>Industrias Locales:</i></b> Artesanías – Muebles – Casas – Varios Utensilios</p> <p><b><i>Madera e industria del papel</i></b> Láminas – Tableros – Papel – Parquet</p> <p><b><i>Industria Alimenticia</i></b> Alimento: En algunos países asiáticos las raíces del bambú es un ingrediente esencial en las ensaladas</p> <p><b><i>Industria Química</i></b> Productos bioquímicos Industria farmacéutica</p> <p><b><i>Energía</i></b> Carbón – Gasificación</p>

Fuente: Londoño, 2002

Desde épocas prehistóricas el hombre asiático le ha dado múltiples usos a la planta de *Guadua* que va desde alimento hasta juguetes y objetos para uso doméstico. Esta planta es reconocida como un recurso de múltiples



ventajas naturales e industriales bien valoradas en el continente Europeo. Sin embargo, en América específicamente en Colombia donde la planta alcanza 51,000 hectáreas, su uso en productos con algún valor agregado solo está estimado en el 1 %. Dentro de ese porcentaje la aplicación más desarrollada se ha presentado en construcciones, las cuales se datan desde varios siglos atrás. Esto hace pensar y asumir que la *Guadua* es una materia prima renovable que se puede convertir en una alternativa económica para diferentes poblaciones (Londoño, 2002; Díaz, 2003).

Las potencialidades y las perspectivas *vs* la subvaloración ha marginado la especie de su industrialización, pero las investigaciones sobre ella están despertando gran interés haciendo que incurse en la fabricación de muebles de lujo, láminas, pisos, aglomerados, además de entrar con mucho éxito en la industria del papel y la textil presentando algunas ventajas sobre las fibras de maderas habitualmente usadas en este campo (Díaz, 2003). No solo se le ha visto una ventaja como fibra, también el uso completo del culmo ha tenido gran aceptación en la industria de la construcción, posicionándola como un recurso accesible para suplir las necesidades de vivienda de los seres humanos y presentando ventajas significativas ante las especies maderables usadas anteriormente.

Si bien se ha visto con suficiencia las múltiples aplicaciones de la *Guadua* en los diferentes campos, es cierto que aún hace falta desarrollar varios aspectos de investigación interdisciplinaria con tendencia a valorarla científicamente, a fin de preservarla bajo condiciones óptimas de propagación y sustentabilidad.

Una visión amplia, definida e inteligente del bambú y específicamente de la *GAK* permite tener un sinnúmero de ventajas aplicadas al campo industrial, con excelentes resultados económicos, buena rentabilidad y protagonismo en los mercados internacionales. Lo anterior permitirá

reconocer su potencial, así como su aprovechamiento como fuente de riqueza que representa.

Desde el punto de vista de la Ingeniería de materiales, la *Guadua* es considerada un material compuesto y no uniforme, lo que indica que los estudios para entenderla deben realizarse desde diferentes puntos de vista. La morfología, la estructura, la resistencia mecánica y su composición química son de fundamental importancia para establecer sus aplicaciones en un futuro.

### 1.3 Antecedentes

Las diferentes culturas de países de Centro y Sur América han visto en la GAK varias aplicaciones basadas principalmente en la construcción y la fabricación de artesanías y laminados (Figura 1-1).



Figura 1-1 Diferentes usos de la *Guadua angustifolia* Kunth

Si bien los usos que se le han dado a la planta son comerciales y de poco valor agregado, aún su potencial no se encuentra completamente explotado. Lo anterior básicamente por un desconocimiento desde el punto de vista de las propiedades fisicoquímicas del material. El reciente auge de la *Guadua* principalmente en los países asiáticos y sus diversas aplicaciones han promovido el interés científico para desarrollar diferentes estudios. La mayoría de estas investigaciones se han enfocado a su clasificación taxonómica, como los realizados por Clark y Cortés (2004) en nuevas especies de Chiapas en México, Filgueiras y Santos Gonçalves (2004) que estudiaron los bambúes en Brasil, Kleinn y Morales-Hidalgo (2006) que realizaron un detallado inventario de *Guadua angustifolia* en la región cafetera de Colombia; entre otros. Estos estudios taxonómicos han sido ampliamente desarrollados y hoy en día se tiene la clasificación taxonómica completa de la GAK, como se puede ver en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2 Clasificación Taxonómica de la Guadua Angustifolia Kunth**

<b>RANGO</b>	<b>TAXONOMIA</b>
División	Espermatofita
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Lilopsidas/Monocotiledoneas
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales/Glumiflorales
Familia	Gramíneas/Poaceae
Tribu	Bambuseae
Género	Guadua
Especie	Angustifolia
Variedad	Cebolla Macana Castilla Rayada Amarilla

Fuente: Giraldo y Sabogal, 1999

Además de la clasificación taxonómica otros estudios basados en la anatomía de la planta y sus componentes (Li, 2004; Okahisa, *et al.*, 2005; Zisheng, *et al.*, 2007), así como la evaluación de sus propiedades mecánicas (Ray, *et al.*, 2005; Ciro, *et al.*, 2005; Obataya, *et al.*, 2007), su composición

química y la variación con respecto a la edad (Scurlock, 2000) y el estudio de las propiedades de sus fibras han permitido un conocimiento amplio del bambú.

La Tabla 1.3 muestra la composición química para la especie *Phyllostachys* en sus variedades heterocycla, nigra y reticulata (Higuchi, 1957). En esta tabla es posible observar que los principales componentes químicos son la celulosa, la lignina y la hemicelulosa y que su concentración es diferente para cada variedad. Por otro lado, Scurlock (2000) ha realizado análisis a diferentes especies de bambú asiáticos empleando diferentes edades del culmo y analizando diferentes partes de este.

De estos estudios se puede resaltar que la composición química del bambú esta relacionada con la edad, la especie, la altura del culmo entre otros factores.

**Tabla 1.3 Composición química del bambú**

<b>Especie</b>	<b>Cenizas (%)</b>	<b>Extractos (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>
P. heterocycla	1.3	4.6	26.1	49.1	27.7
P. nigra	2.0	3.4	23.8	42.3	24.1
P. reticulata	1.9	3.4	25.3	25.3	26.5

Fuente. Higuchi, 1957

El estudio de las propiedades mecánicas del bambú (Tomalang, *et al.*, 1980; Li, 2004; Ray, *et al.*, 2005; Obataya, 2007) y en los últimos años de la *Guadua* (Villegas, 2003; Ciro, *et al.*, 2005; Osorio, *et al.*, 2007) han demostrado que este material presenta un comportamiento mecánico comparable al del acero y de ahí su aplicación en construcción y ambientes en donde se deba soportar grandes cargas.

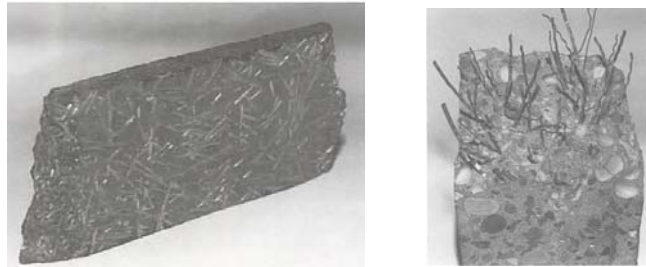
Takeuchi y González (2007) estudiaron diferentes muestras de *Guadua angustifolia* Kunth provenientes de distintas regiones de Colombia y encontraron que el módulo de Young tiene valores promedios entre 15 y 19 MPa, estos valores son comparables con los del acero al carbón 19.5 – 20.5 MPa (Koshkin y Shirkévich, 1975).

El estudio y uso de las fibras del bambú ha tenido diversas orientaciones dentro de la investigación. Una de las aplicaciones más desarrollada de la *Guadua* es el refuerzo de materiales compuestos, donde se utilizan fibras naturales, incluyendo fibras de algunas especies asiáticas de bambú en matrices poliméricas con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas del material.

El interés en la utilización de fibras naturales de bambú, se deriva de la aceptación de esta planta como material compuesto natural, debido a que todo su culmo consiste en un arreglo alineado de fibras de celulosa embebidas en una matriz de lignina. La alineación de estas fibras a lo largo del culmo es lo que provee al bambú una alta rigidez en esta dirección (Ghavami, *et al.*, 2003; Obataya, *et al.*, 2007), esta composición particular de las especies de bambú es el modelo de un material polimérico reforzado con fibras naturales.

Existen diferentes estudios de materiales reforzados, el cemento, es uno de los materiales que se ha utilizado como matriz para la creación de materiales reforzados que aumenten sus propiedades mecánicas (Johnston, 2001). Los estudios que se han desarrollado en este aspecto se han centrado en la utilización de la fibra de una especie al azar de bambú y la respuesta del material reforzado, sin tener en cuenta la cantidad de fibra que posee la especie que se utiliza o sin tener conocimiento de la distribución de dichas fibras a lo largo de su culmo.

En la Figura 1-2 se puede observar cemento reforzado con diferentes clases de fibras.



Fuente Johnston, 2001

**Figura 1-2 Cemento reforzado con fibras a) fibra de vidrio, b) fibra de acero**

Por otro lado, Surlok, 2000 y Takeuchi, 2007 estudiaron las aplicaciones del bambú y demostraron que las diferentes especies de bambú poseen importantes aplicaciones en diferentes ámbitos industriales, en donde la industria papelera y textil destacan por su importancia. Sin embargo, los estudios realizados alrededor de la utilización del bambú en estas industrias no han sido suficientes para que los países de Centro y Sur América, en los cuales se cultiva diversos géneros de bambúes exploten los potenciales de la planta. Estos países han dedicado principalmente la utilización del bambú en la fabricación de muebles y artesanías además de tener una amplia utilización en la construcción de viviendas. Debido a los costos elevados en la materia prima utilizada para la construcción de vivienda, una necesidad básica se convierte en un lujo en países de bajo desarrollo. Por esta razón, resulta evidente la necesidad de proponer materiales adecuados, que permitan satisfacer una de las necesidades básicas del ser humano a un precio razonable y con altos niveles de seguridad.

En la búsqueda de materiales con estas condiciones se ubica la *GAK*, el cual por su parte, se convierte en un material alternativo en la construcción de vivienda con múltiples beneficios y bajos costos, cuyas aplicaciones en diferentes áreas ya han sido reportadas con anterioridad (Scurlock, 2000; Becker y Held, 2004; Ciro, et al, 2005; Gallo, 2009). Las construcciones basadas en *Guadua* son ampliamente conocidas en países como Colombia, en donde en los últimos años se ha tratado de darle un lugar privilegiado a esta planta. Diferentes entidades tanto públicas como privadas han apostado en la investigación y mejoramiento de la utilización de esta.

## 1.4 Justificación

Durante el estudio de nuevos materiales que presentan diferentes potencialidades y usos asociados a su estructura, composición o su funcionalidad. En este caso la *GAK* es un material que en las últimas décadas ha llamado la atención de muchos investigadores en diferentes áreas. Es bien sabido que el bambú es una de las familias de plantas más numerosas que se encuentran en la tierra, contando con más de 800 especies diferentes (American Bamboo Society 2006; Loretta, *et al.*, 2008), y que tan solo en China se cuenta con más de 500 especies nativas (China Bamboo Center). Por esta razón, los países asiáticos realizan una fuerte investigación en este material y actualmente cuentan con clasificaciones de la especie, caracterizaciones químicas y físicas, además del estudio de diversas aplicaciones de diferentes partes de esta planta. Si bien los bambúes asiáticos difieren en forma y tamaño de los bambúes americanos, la composición química y las propiedades mecánicas de ambos no poseen muchas diferencias.

Después de haber revisado diferentes estudios e investigaciones donde se usaron diferentes especies de bambúes asiáticos, se plantea la necesidad de estudiar las cuatro variedades de *GAK*, más utilizadas en la región central de Colombia, los cuales están encaminados a mejorar el desarrollo y aplicación de ésta especie, en donde se involucren diferentes técnicas de caracterización.

Es bien conocido que la *GAK* a pesar de poseer excelentes características para diferentes aplicaciones, no se tiene aún un conocimiento completo de su estructura, composición y propiedades mecánicas y mucho menos una correlación entre ambas.

## 1.5 Hipótesis

La composición química, estructura, microestructura y morfología de los materiales esta relacionado con las propiedades físicas que exhiben. Por

otro lado, la anisotropía en los materiales biológicos produce un comportamiento diferente que depende de la dirección que se estudie. Por consiguiente, la composición química de la *Guadua angustifolia* Kunth esta relacionada con el comportamiento mecánico de tal forma que este comportamiento esta dado por el contenido de fibra insoluble. Las *Guaduas* con mayor contenido de fibra insoluble tendrán módulos de ruptura y módulos de Young mayores.

## 1.6 Objetivo

### *Objetivo General*

- Correlacionar la composición química con la respuesta mecánica en compresión y flexión por medio de un análisis estadístico de correlación de *Pearson* de cada una de las cuatro variedades: Castilla, Rayada Amarilla, Cebolla y Macana de la especie *GAK* para identificar los componentes químicos que describen su comportamiento mecánico.

### *Objetivos específicos*

- Determinar el contenido de lignina y carbohidratos estructurales, celulosa y hemicelulosa de la parte basa de cuatro variedades de *GAK* (Cebolla, Macana, Rayada Amarilla y Castilla) en dos edades diferentes del crecimiento por medio de un análisis composicional para observar el porcentaje de degradación de los componentes principales de la *Guadua*.
- Determinar el contenido fibra soluble e Insoluble de la parte basa de cuatro variedades de *GAK* en dos edades de crecimiento por medio del método 985.29 determinación de fibra dietaria AOAC 2000, para encontrar la variación de la fibra a través de la edad.
- Conocer mediante microscopia electrónica de barrido la morfología de la parte basa de cuatro variedades de *Guadua*



*angustifolia* para determinar la los cambios morfológicos de cada uno de los culmos.

- Determinar la estructura cristalina de la *GAK* mediante la técnica de difracción de Rayos-X en la parte basa de cuatro variedades de *GAK*, para identificar la orientación cristalográfica de los compuestos cristalinos.
- Determinar la respuesta mecánica en flexión y compresión de las cuatro variedades de *GAK* en dos etapas diferentes de su crecimiento para establecer el cambio en las propiedades mecánicas a medida que avanza la madurez de la Guadua.

---

# Capítulo 2

## 2 MARCO TEÓRICO

---

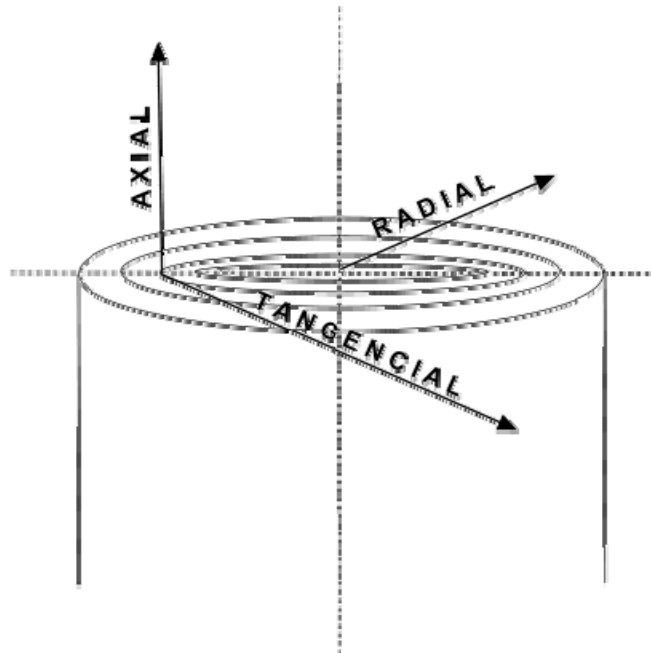
### 2.1 Generalidades del Bambú

No se puede fijar el origen de la palabra bambú, una de las hipótesis que más se maneja es el caso de la raíz oriental que afirma que la palabra **bambú** tiene su origen en el sonido que hacen los segmentos verdes del tallo cuando se queman en algunas celebraciones tradicionales de algunos grupos étnicos malayos y chinos *bam...boom...* las cuales tenían como finalidad ahuyentar a los malos espíritus (Cortés, 2005).

Otra hipótesis que se usa para el origen de la palabra, viene dado en la obra “Canon de la medicina” de Avicena (980AC), la que se refiere al medicamento tabaxir o tabashir, el cual es un vocablo árabe que significa jugo, leche o líquido condensado extraído de una planta llamada mambu, palabra de la que muchos autores derivan la palabra bambú. Alrededor del bambú se ha generado diferentes investigaciones y se le ha atribuido diversas funciones. La primera ilustración de carácter científico está en el “*Hortus Malabiricus*” de van Rheede, publicada en 1678, en esta aparece un bambú que en lenguaje local malayan se conocía como lly.

Sin importar cual sea el origen de la palabra bambú; hoy en día es una palabra conocida y que al escucharla podemos referirnos a una clase de planta en particular. El bambú tiene la capacidad como pocas plantas, de poder ser utilizado como planta o como material. Cuando hablamos del bambú como material, este se puede considerar como un típico material compuesto, debido a que cuenta con un arreglo de fibras embebidas en una

matriz. Esto lo hace acreedor a una estructura rígida y anisotrópica. Esta estructura es la que microscópicamente podemos distinguir como tallo o culmo y es posible distinguir dos direcciones la axial: la cual se refiere a la dirección de crecimiento de la planta y la radial: la cual abarca al tallo desde la parte interna hasta la capa externa de este como se muestra en la Figura 2-1.



**Figura 2-1 Direcciones de la madera y bambú**

Estas direcciones, debido a la anisotropía de la planta, manifiestan diferentes propiedades, además por tratarse de un material natural, algunas condiciones como las climáticas, la edad, el terreno de siembra entre otras, también afectan sus propiedades químicas y físicas.

#### *Clasificación de los bambúes*

Los bambúes generalmente están clasificados de acuerdo al sistema radicular como cespitosos (sistema radicular controlable) y rizomatosos (sistemas radiculares no controlables) o según sus tamaños como enanos, medianos, pequeños o gigantes. En el mundo existen unas 1300 especies diferentes de bambú los cuales varían en su velocidad de crecimiento, ancho

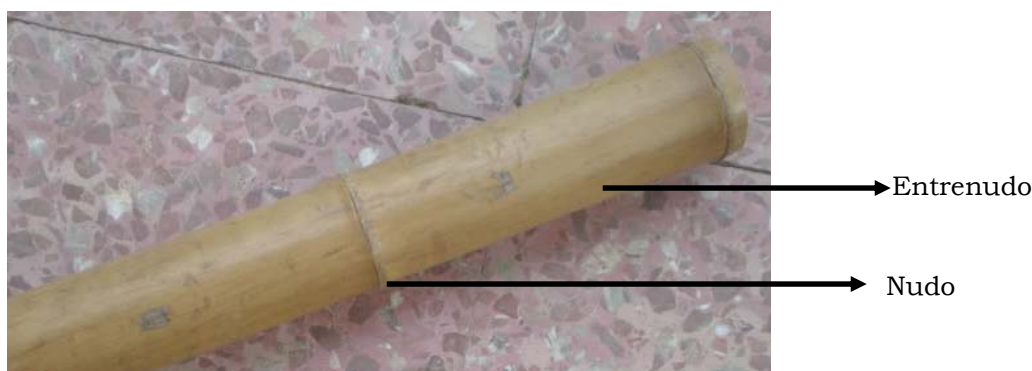
de culmos, altura, color y propiedades físicas y químicas. Por lo anterior, su clasificación taxonómica no está completamente descrita. Los bambúes se encuentran distribuidos desde el nivel del mar hasta los 4000 metros de altura. Así mismo, se pueden encontrar en cuatro de los cinco continentes exceptuando a Europa, en donde no se ha reportado ninguna especie nativa de bambú. En América se cuenta con varias especies de bambú diferentes a las especies asiáticas. El sur de Brasil es la región con mayor diversidad de bambúes de América representado por 22 especies (Londoño, 2002). Por su parte, algunos países de América cuentan con géneros nativos de especies de bambú con propiedades físicas completamente únicas y estas a su vez, poseen diferentes variedades haciendo de esta planta una de las especies más abundantes sobre la tierra. Dentro de los diferentes géneros que se tienen de bambúes nativos de América se encuentra la *Guadua*, la cual está ligada a la tradición e historia de muchos de los países de Sur América, considerada como un género nativo de Colombia e introducida a diferentes países del mundo (Espinosa, 2004).

### **2.1.1 Guadua**

El género al cual pertenece la *Guadua* reúne aproximadamente 24 especies completamente descritas y muchas más, aún no catalogadas. La *Guadua* se encuentra distribuida desde San Luis Potosí, México hasta Uruguay y Argentina, exceptuando Chile y las Islas Caribe. Las especies de este género difieren con los demás bambúes principalmente por sus culmos largos de diámetros gruesos y por las hojas caulinares de forma triangular (Díaz, 2003). Los usos potenciales de las especies de *Guadua* son infinitos. Esta planta sobresale debido a que es un excelente recurso renovable, de rápido crecimiento y fácil manejo, la cual, brinda beneficios económicos, sociales y ambientales. La *Guadua* contiene un alto porcentaje de agua; se ha establecido que una hectárea de *Guadua* puede almacenar hasta 30000 litros, captura CO<sub>2</sub> y produce oxígeno. Este aspecto de gran importancia en el protocolo de Kyoto, el cual es un acuerdo internacional que tiene por objetivo reducir las emisiones de gases que causan calentamiento global,

además de estos beneficios como planta, la *Guadua* vista como material es una fuente inagotable para la investigación química de su biomasa y juega un papel importante en la industria artesanal, la del carbón y la del papel (Villegas, 2003). Además, la *Guadua* esta clasificada como “acero vegetal”, debido a que es utilizada en algunos países asiáticos en la industria del fibrocemento en reemplazo de la fibra de asbesto. Adicionalmente, la *Guadua* es la mejor materia prima en la producción de pisos e irremplazable en la construcción de vivienda para ricos y pobres (Corpocaldas, 2002).

La *Guadua* está constituida, como todas las especies de bambú, por un sistema de ejes vegetativos segmentados, los cuales forman alternadamente nudos y entrenudos, como se muestra en la Figura 2-2.



**Figura 2-2 Tallo de *guadua angustifolia* Kunth**

## **2.2 *Guadua angustifolia* Kunth (GAK)**

La clasificación taxonómica de la *Guadua* se desprende desde el momento de la conquista. Los cronistas la llamaron “cañas” y su nombre posiblemente de origen quechua, se generalizó durante la colonia en la Nueva Granada. Los científicos Humboldt y Bompland la clasificaron en 1801 como *Bambusa guadua* o *Nastus guadua*. El botánico Alemán Karl Sigismund (1788;1850) conocido como Kunth, en 1820, después de adquirir alguna experiencia en trabajos realizados con la familia de las gramíneas, decidió que los bambúes de América Latina debían agruparse en un género

diferente, y no dentro del género bambusa. Por esta razón Kunth clasificó la colección de plantas americanas reunidas por Humbolt y Bompland y publicó su trabajo entre 1822 y 1825, identificando ocho especies como *Guadua angustifolia* y en honor a su nombre se le conoce como *Guadua angustifolia* Kunth.

En trabajos realizados como los de Young y Judd (1992) es posible encontrar varias de las características de la GAK, las cuales la distinguen de las demás especies de bambú que existen en la tierra. Una de las característica más importante y a la que se deben muchas de sus aplicaciones y potencialidades, consiste en que puede alcanzar entre 10 y 20 m de altura y en algunas condiciones 30 m. Además, sus diámetros pueden alcanzar hasta 25 cm, mientras que las otras especies de guaduas no sobrepasan los 10 m de longitud (Díaz, 2003).

La resume la clasificación taxonómica y las condiciones generales para el buen desarrollo de la planta.

**Tabla 2.1 Generalidades de la *Guadua angustifolia* Kunth**

<b>GUADUA</b>			
Nombre común		Guadua	
Nombre científico		<i>Guadua angustifolia</i> Kunth	
Familia		Gramíneas	
Tribu		Bambusea	
Subgénero		Bambusa	
Hábitat		0 m.s.n.m – 2200 m.s.n.m	
Precipitación		Superior a 1200 mm/año	
Humedad relativa		75% - 85%	
Desarrollo óptimo	Altitud	900-1600 m.s.n.m	Estas Propiedades son factores determinantes en la dimensión del diámetro y la altura de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth
	Precipitación	2000 -2500 mm/año	
	Temperatura	20°C – 26°C	
Formas		Castilla – Macana - Cebolla	

Fuente: Díaz, 2003

La *Guadua* es endémica de América considerándose nativa de Colombia Venezuela y Ecuador. Se presenta en el mayor rango de altitud entre todos los géneros de bambú, desde el nivel del mar hasta los 2600 metros sobre el nivel del mar. No obstante de que posee un rango de altitud considerable, las especies con mejores propiedades se ubican en los 1800 a 1900 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m).

### 2.2.1 Fases de desarrollo de la Guadua

La Figura 2-3 muestra las cuatro fases del desarrollo de la GAK.



Fuente: Universidad del Quindío

**Figura 2-3 Fases del desarrollo de la *guadua angustifolia* Kunth**

La GAK antes de alcanzar su altura final cursa por diferentes estados. El entendimiento total de cada uno de estos estados proporciona un mejor aprovechamiento de la planta. La cantidad de estados durante el crecimiento de la planta varía entre autores. Los estados conocidos como Retoño, Joven, Maduro y Seco o Sobremaduros son los aceptadas por la mayoría de los autores (Londoño, 2002; Díaz, 2003).

Los diferentes estados de desarrollo de la planta tienen entre sí propiedades físicas y químicas diferentes. Diversos estudios han demostrado que el estado de la planta es importante dependiendo de la aplicación final que se desee con esta (Scurlock, 2000; Ghavami, *et al.*, 2003; Li, 2004). Por ejemplo, la construcción de viviendas en *Guadua* se

recomienda realizarla con Guaduas no muy maduras, es decir, entre los 3 y 4 años después de haber sido plantadas (mundo de la guadua).

### **2.2.2 Partes de la *Guadua angustifolia* Kunth**

De acuerdo al centro Nacional para el estudio del bambú, la *Guadua angustifolia* se encuentra dividida en cinco partes: Rizoma, Cepa, Basa, Sobrebasa, Varillón y Copa. Cada una de las partes de la *Guadua* tiene usos y aplicaciones diferentes que dependen de las propiedades físicas, químicas y mecánicas que exhiben.

**Rizoma** Tallo modificado subterráneo, donde absorbe nutrientes que constituyen el soporte principal de toda planta. El rizoma de la *Guadua* es paquiforme el cual se distingue por su forma aglutinada en la que se presenta.

**Cepa** Parte del culmo de mayor espesor y diámetro con una longitud aproximada de 4 metros

**Basa** Parte del culmo con diámetro un poco más pequeño que la cepa con una longitud aproximada de 11 m. Esta sección es utilizada en columnas y vigas en construcción.

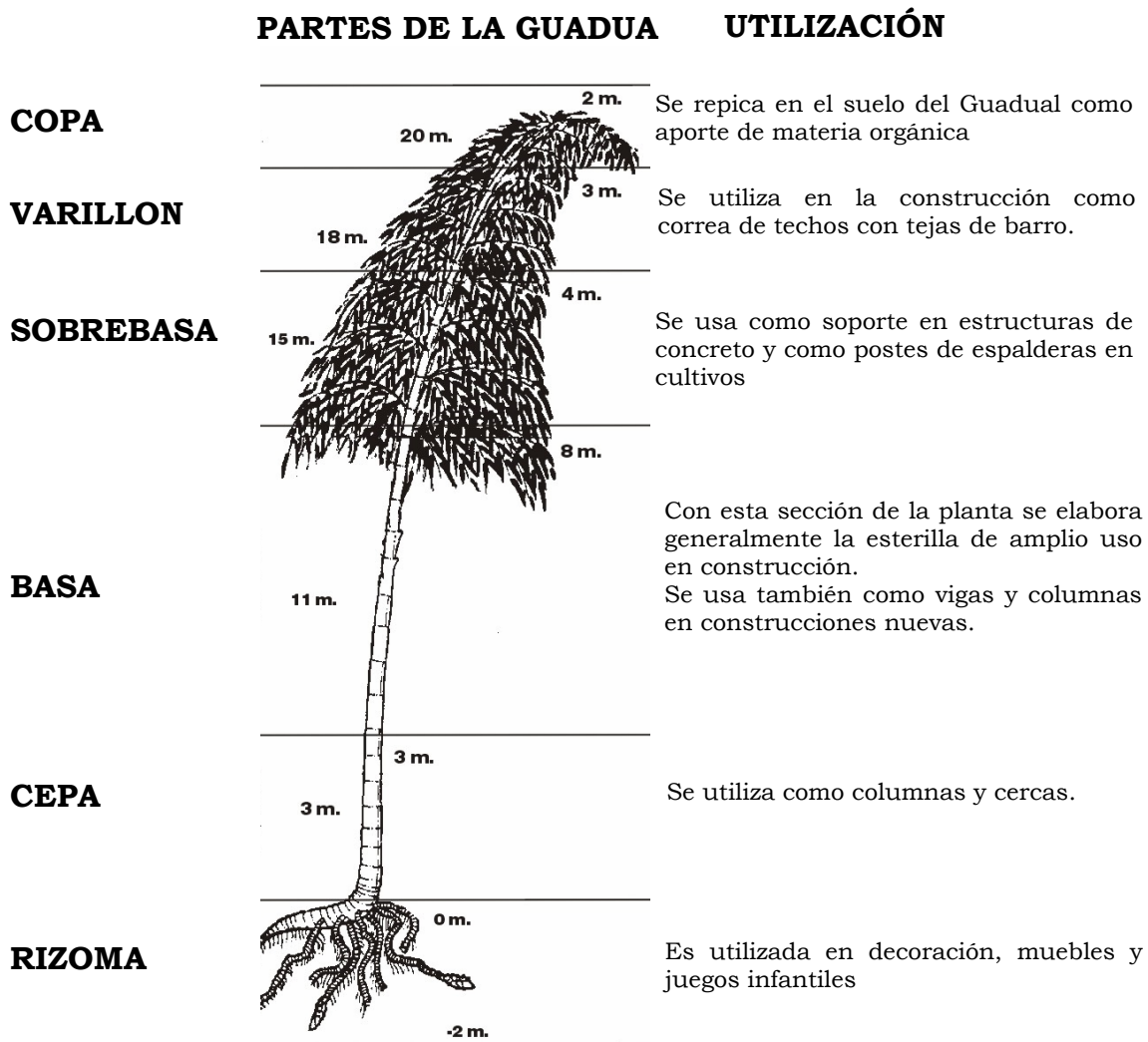
**Sobrebasa** Diámetro menor que en la cepa y la basa con una longitud aproximada de 4 m.

**Varillón** Sección con el diámetro más pequeño del culmo, con una longitud aproximada de 3 m.

**Copa** Parte apical de la *Guadua*, con una longitud entre 1.20 a 2 metros.

La Figura 2-4 muestra las partes del tallo de GAK y sus principales aplicaciones.





**Figura 2-4 Partes de la *Guadua angustifolia* Kunth y sus principales aplicaciones**

Los usos principales del bambú se derivan de los rizomas y culmos. Conocer las propiedades físicas y químicas de cada una sus partes, así como las diferencias entre esas propiedades y las variedades de esta planta, es un factor importante en el aprovechamiento de este material. Las dos partes más utilizadas de este material son descritas a continuación.

### **Sistema Rizomático-Radical**

En los bambúes el sistema rizomático radical comprende el rizoma o tallo modificado de desarrollo horizontal con las correspondientes ramificaciones y las raíces de tipo filamentosas en la parte inferior, muchos autores diferencian y tratan separadamente el rizoma y las raíces (Díaz, 2003).

### **Culmos**

La estructura anatómica del culmo de la GAK, determina sus propiedades. A primera vista, la construcción anatómica de los culmos de bambú es simple debido a que el crecimiento y la diferenciación celular se produce rápidamente y las variaciones entre los géneros y las especies existentes es pequeña y se hacen despreciables cuando se compara con la heterogeneidad de las más de 20000 especies de madera. Existen algunas diferencias considerables dentro del culmo de las especies de bambú, estas diferencias son de carácter taxonómico y tienen implicaciones sobre las propiedades y procesamientos de la planta (Liese, 2002).

Los tejidos fundamentales que se encuentran en los tallos de las plantas están divididos en tres parénquima, esclerenquima y colénquima (Fuentes, 2001). Dentro de los culmos de la GAK es posible identificar los dos primeros. El tejido parenquitimoso posee generalmente células verticalmente elongadas en las cuales se almacena los almidones presentes en la *Guadua*, es un tejido no funcional pero de vital importancia. Por otro lado, el tejido esclerenquitimoso está constituido por fibras las cuales, en esta especie, se encuentran alrededor de los haces vasculares, contribuyen con el 40% -50% del tejido total del culmo y con el 60%-70% de su peso, es un tejido funcional encargado de la distribución de nutrientes desde la base hacia todas las partes de la planta. La distribución de estos dos tejidos no es uniforme en ninguna de las direcciones de la planta (radial y axial) debido a la anisotropía que esta presenta. Se ha demostrado que la cantidad de tejido esclerenquitimoso incrementa en la dirección longitudinal desde la base hasta la punta, mientras que el tejido parenquitimoso decrece

(Londoño, 2002). En general, los culmos de la *Guadua* están constituidos por un 51% de tejido parénquima, un 40% de tejido esclerénquima y un 9% de tejido conductivo. Este tejido conductivo hace referencia a los haces vasculares, los porcentajes pueden variar entre cada una de las especies. A diferencia de las especies madereras, el porcentaje de tejido conductivo presente en el bambú es muy bajo comparado con el de las especies de maderas duras 30% y para el de maderas blandas 70% (Walter, 2006).

### **2.2.3 Variedades de la *Guadua angustifolia* Kunth**

Dentro de la *GAK* se reúnen algunas variedades y formas como la variedad bicolor o rayada amarilla, negra, macana, castilla, cebolla entre otras. Para el desarrollo experimental de este trabajo, se utilizaron cuatro de las principales variedades de *Guadua* que se desarrollan, cultivan y procesan en Colombia. A simple vista, estas *guaduas* se pueden diferenciar en su diámetro. Algunas de las principales características de estas cuatro variedades de *Guadua* se nombran a continuación.

#### ***Variedad Rayada Amarilla***

Es también conocida como *Guadua bicolor*, aunque no es muy común es una de las más ornamentales y posee gran aplicación en la fabricación de artesanías. Se diferencia de la especie por tener rayas longitudinales amarillas en el culmo, es endémica de Colombia (Giraldo y Sabogal, 1999).

#### ***Variedad Cebolla***

Esta *Guadua* se reconoce por sus culmos gruesos y rectos con entrenudos largos. Es utilizada principalmente en la elaboración de esterilla, fabricación de muebles y construcción de viviendas (Perea, *et al.*, 2003). Tiene menor cantidad de tejido esclerénquima y haces fibrovasculares. Posee diámetros mayores a 100 mm con espesores de 10 mm en la parte media de la cepa. Tiene una acanaladura apenas perceptible que se prolonga hasta la mitad del entrenudo. Su desarrollo se presenta en suelos ricos de nutrientes, alta humedad y pendientes bajas.

**Variedad Macana**

Generalmente, posee entrenudos cortos con distancias regulares, paredes gruesas y diámetros muy uniformes. Ha mostrado una excelente resistencia por lo que tiene un óptimo comportamiento en las construcciones (Díaz, 2003). Presenta acanaladura visible y prolongada hasta más allá de la mitad del entrenudo. Sus diámetros varían entre 70 mm – 150 mm con un espesor de 12 mm, se desarrolla por lo general en suelos con pocos nutrientes y que presenten pendientes pronunciadas. Es la forma más predominante de *Guadua angustifolia* Kunth, representada por un 76 % (Perea, *et al.*, 2003).

**Variedad Castilla**

Esta variedad posee culmos que alcanzan hasta los 25 cm de diámetro, con paredes gruesas y generalmente se utiliza como columna en construcciones y en la fabricación de artesanías de grandes volúmenes. Se desarrolla en suelos húmedos y ricos en nutrientes (Perea, *et al.*, 2003).

**2.2.4 Ventajas de la *Guadua angustifolia* Kunth**

La GAK como se ha mencionado previamente es una planta de múltiples características y diversas potencialidades. Existen muchos factores que hacen de esta planta un material con diversos usos y los cuales la han posicionado en una de las nuevas ramas de investigación. Algunas de las ventajas que presenta esta planta ante las otras especies madereras altamente usadas e incluso ante otras especies de bambú son presentadas a continuación.

Es un recurso completamente sostenible y renovable, porque tiene la capacidad de automultiplicarse vegetativamente, es decir, no necesita semilla para su reproducción.

Su velocidad de crecimiento es mucho mayor que la de cualquier especie utilizada para reforestación y construcción, puede alcanzar una velocidad de 11 cm a 13 cm por día; alcanzando su altura total en solo seis meses. Esta especie se puede desarrollar en diversas condiciones climáticas y en

diversas alturas alrededor de la mayoría de los continentes, exceptuando Europa (Díaz, 2003).

La GAK es una planta fijadora de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hasta el punto que su madera no libera el gas retenido después de ser procesada como material (Gallo, 2009). Esta característica ha hecho que algunos de los países involucrados en el protocolo de Kyoto la tengan en cuenta como alternativa (Díaz, 2003).

Tiene la capacidad de evitar la movilización de los terrenos conservando efectivamente los suelos en los que se encuentra sembrada, de ahí que resulte de vital importancia su siembra en suelos propensos a deslizamientos, derrumbes, erosiones y/o remociones (SIG-GUADUA).

Los guaduales propician una regulación hídrica, protegen los caudales superficiales y tienen altas capacidades de almacenamiento de agua en el suelo (Becker y Held, 2004). Los mismos autores no hallaron relación entre la capacidad de almacenamiento de agua y el diámetro ponderado medio de los agregados estables de agua.

Posee excelentes características físicas, permitiendo su empleo en todo tipo de miembros estructurales. Además, su sección circular generalmente hueca la hace más liviana, fácil de transportar y almacenar. Es importante mencionar que la Guadua puede combinarse con otros materiales de construcción obteniendo compuestos con mejores características estructurales (Díaz, 2003).

Dependiendo de las aplicaciones que se quiera con la planta, específicamente cuando se utiliza como material, presenta algunas desventajas, principalmente asociadas a la propagación de insectos, la pérdida de resistencia, la flamabilidad entre otros.

### 2.3 Composición Química de la *Guadua*

La composición química de los bambúes y por ende de la *GAK*, es similar a la de la madera. La madera es un material complejo y no uniforme en tres direcciones axial, radial y tangencial. Esta no uniformidad se presenta en su anatomía, propiedades mecánicas y composición química (Brady, *et al.*, 2002). Los bambúes al igual que las maderas se pueden considerar como complejos de sustancias poliméricas naturales: celulosa, hemicelulosa y lignina y debido a su anisotropía, estas sustancias no se encuentran distribuidas uniformemente en las células y su concentración varía de una región morfológica a otra (Hon y Shiraishi, 2000).

En los últimos años, las variaciones en la composición química del bambú en la dirección axial y dirección radial han sido objeto de estudio y se ha podido establecer que la respuesta mecánica de la planta se ve afectada por sus componentes químicos. Por esta razón, es posible encontrar diferentes trabajos de investigación relacionando estas variaciones con alguna dirección analizada. En trabajos realizados por Azmy (1991); Zhou (1992); Lybeer y Scurlock (2000); Liese (2002); Kumar (2003); Li (2004) y Koch (2005), es posible encontrar la composición química del bambú con relación a su edad y parte del culmo analizado. Por otro lado, en trabajos realizados por Obataya *et al.* (2007), Ray, *et al.* (2005) y Ghavami, *et al.* (2003) se puede encontrar la respuesta mecánica de la planta con relación al culmo y la edad.

Si bien se han desarrollado diferentes trabajos donde se ha tratado de expresar la composición química del bambú y sus variaciones, así como trabajos donde se encuentre la respuesta mecánica de la planta y su dependencia con la edad o parte del culmo, no se ha encontrado ningún trabajo en el cual se relacione la composición química de la planta con la respuesta mecánica. Más aún, no se encuentra ningún trabajo de investigación en el cual se obtengan estas composiciones y correlaciones en la *GAK*.

Los tres principales componentes del bambú al igual que el de la madera son la celulosa, hemicelulosa y la lignina, constituyen alrededor del 90 % de la masa total de la planta y entre los tres forman un material compuesto, donde las fibras de celulosa se encuentran embebidas en una matriz de lignina y hemicelulosa. Un esquema de la composición del bambú se puede observar en la Figura 2-5.



**Figura 2-5 Esquema de los componentes del bambú**

También es posible encontrar otros componentes poliméricos presentes en menor cantidad y concentraciones variables como almidón, pectina y algunos minerales. Algunos de estos compuestos juegan un papel importante en la conservación y durabilidad de la planta (Li, 2004). La GAK posee además algunos constituyentes minoritarios representados por compuestos químicos, impurezas orgánicas como aceite que le dan el color o que actúan como preservadores contra el entorno y los insectos; así como minerales inorgánicos como la sílice. Estos compuestos pueden representar un 10 % de la composición total (Askeland y Phulé, 2004).

### 2.3.1 Fibra en el bambú

El bambú se puede considerar como un material fibroso, donde las fibras se alinean paralelamente en dirección longitudinal en los entrenudos, mientras que en los nudos las fibras se cruzan en todas las direcciones (Askeland y Phulé, 2004).

La fibra total que encontramos en las plantas se encuentra constituida en su mayoría por fibra insoluble y un porcentaje más pequeño de fibra soluble. Esta clasificación de la fibra viene dada desde los años sesenta y se basa en la solubilidad de los diferentes compuestos en el agua. La mayoría de las plantas poseen diferentes porcentajes de fibra soluble e insoluble, las variaciones de estos contenidos se presentan sin importar que las plantas pertenezcan a la misma especie; como en el caso del bambú, donde las diferentes variedades o formas estudiadas poseen diferentes porcentajes tanto de fibra soluble como insoluble.

Las fibras de diferentes bambúes han sido usadas en los últimos años en la industria textil, del papel y en refuerzo para materiales compuestos. La longitud de las fibras de bambú varía dependiendo de la especie y es un factor importante dependiendo de la aplicación final. Algunas longitudes de fibras se encuentran reportadas en Tabla 2.2, estas longitudes son más largas que las reportadas en las maderas duras.

La fibra de bambú es una fibra natural, recurso renovable y disponible mundialmente, son biodegradables, no generan gases tóxicos ni dejan residuos sólidos en combustión su peso es aproximadamente un tercio de las fibras de vidrio, no produce abrasión y presentan un módulo de elasticidad muy alto (Lucena, *et al.*, 2009).



**Tabla 2.2 Longitudes de algunas fibras de bambú**

<i>Especie</i>	<i>Longitud de la fibra (mm)</i>
Bambusa tulda	3
Bambusa vulgaris	2.3
Dendrocalamus giganteus	3.2
<i>Guadua angustifolia</i>	1.6
Phyllostachys edulis	1.5

Fuente: Liese y Grosser, 1972

### **Fibra Insoluble**

La fibra insoluble es aquella fibra con poca capacidad para captar agua y no puede ser procesada por las enzimas digestivas del ser humano. Este tipo de fibra esta constituida por celulosa, algunas hemicelulosas y algún porcentaje de lignina.

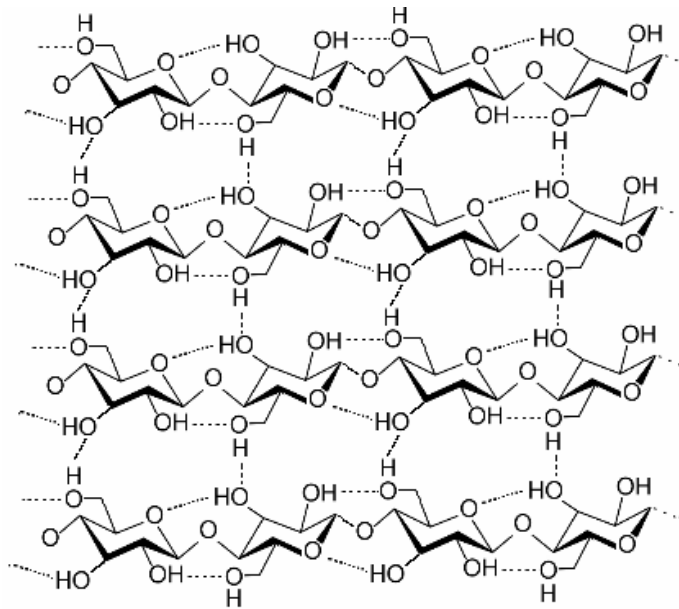
El componente mayoritario del bambú es la fibra insoluble, la cual se encuentra representada en su mayoría por celulosa, la que a su vez se encuentra rodeada de capas de hemicelulosa amorfa y esta hemicelulosa finalmente se encuentra cubierta de lignina. La celulosa es un sustancia vegetal altamente insoluble mientras que la hemicelulosa y la lignina poseen ciertos grados de solubilidad en el agua, por esta razón la celulosa se clasifica como fibra insoluble, mientras que la hemicelulosa y la lignina se pueden encontrar clasificadas como fibra soluble y/o fibra insoluble en alguna clase de vegetales (Salas-Salvado *et al.*, 2008).

### *Celulosa*

La celulosa es un polímero considerado el más abundante en el reino vegetal. Puede presentarse en algunas plantas con alta cristalinidad, en otras con estructuras cristalinas menos rígidas y por último también existen

algunas algas que tienen en su composición celulosa estructuralmente amorfa (García *et al.*, 2003).

La Figura 2-6 muestra la molécula de celulosa. Esta molécula es una cadena recta polimérica, de elevado peso molecular, formado por unidades monoméricas de glucosa de fórmula empírica  $(C_6H_{12}O_6)_n$ , con una oscilación de  $n$  entre 5,000 y 13,000, la longitud de este polímero está asociada a la cantidad de monómeros; cuando tienden a 13,000 se dice que tiene una longitud de  $5\ \mu m$  y cuando tiende a 5,000 su longitud es de  $2.5\ \mu m$  (Urquiza, 2009). La Glucosa es un monosacárido no hidrolizable, compuesto por grupos hidroxilos y un grupo carbonilo clasificada como aldohexosa debido a su función de aldehído. La Glucosa presenta diferentes esteroisómeros, en su forma  $\beta$ -D glucopiranososa una molécula de glucosa se une a otra gracias a los -OH de sus carbonos 1-4 para formar celobiosa a través de enlaces  $\beta$  y al unirse varias de estas moléculas da origen a la celulosa.



**Figura 2-6 Cadenas de Celulosa con enlaces intermoleculares en el mismo plano y en planos superiores e inferiores**

Las largas cadenas de celulosa se mantienen juntas a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Estos enlaces se establecen con otras

cadena que estén en el mismo plano, así como con cadenas que se encuentren en planos superiores e inferiores para formar paquetes fuertes y fibrosos. Esto hace que la celulosa sea muy apropiada para su función estructural en las plantas (Urquiza, 2009).

La celulosa es uno de los mayores componentes del bambú y es la responsable de la mayoría del porcentaje de la fibra insoluble. Es posible encontrar celulosa cristalina, en donde los delgados filamentos de esta, se encuentran orientados paralelamente en la dirección axial del culmo. Esta orientación y naturaleza cristalina de la celulosa hace que el bambú sea resistente a los ataques químicos a los que se somete en industrias como la de pulpa de papel y se relaciona con las propiedades mecánicas que esta planta presenta (Walker, 2006).

En el polímero de la celulosa es importante destacar la presencia de grupos H-C-OH y H-C-CH<sub>2</sub>OH. Estos grupos son polares y condiciona la relación entre el agua y la madera. Esta polaridad otorga al material propiedades higroscópicas (Alonso, 2006).

La concentración de celulosa en el bambú es similar que la concentración de celulosa en la madera, es bien sabido que la concentración de este polímero está ligado al área morfológica de estudio y a la edad de la planta. Algunos estudios han demostrado que la concentración de celulosa varía desde la pared interna hacia la externa tanto en las maderas como en los bambúes (Hon y Shiraishi, 2000).

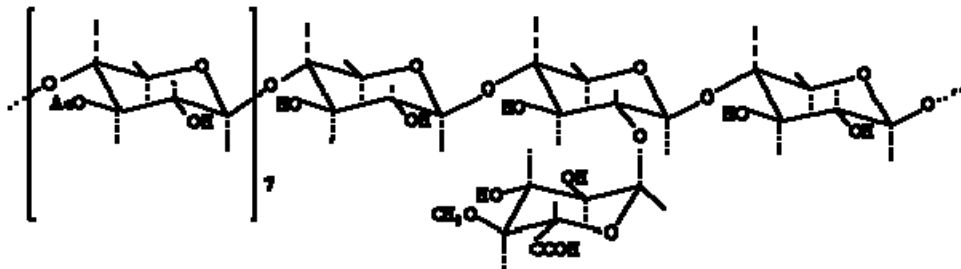
### *Hemicelulosa*

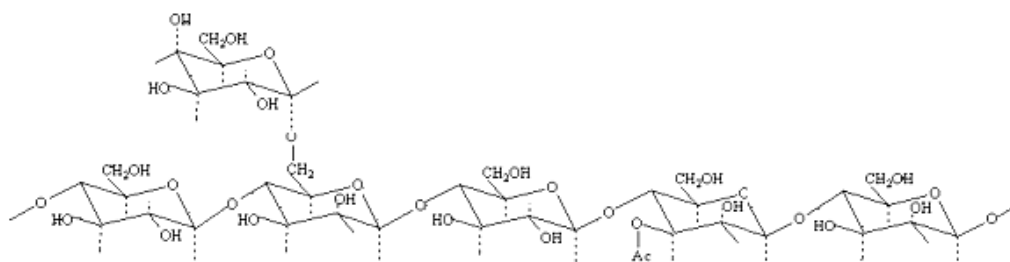
Son polisacáridos heterogéneos más complejos, más pequeños y de menor peso molecular que los celulósicos. Algunos tipos de hemicelulosa son mejor degradados que otros; las hemicelulosas se componen de restos de azúcares de galactosa, manosa, xilosa y arabinosa así como de restos de ácidos urónicos. La extracción de hemicelulosa de la pared celular se obtiene mediante soluciones alcalinas muy diluidas. A diferencia de la

celulosa, el estudio de la distribución de la hemicelulosa presenta un grado de mayor dificultad debido a que las técnicas histoquímicas son generalmente no específicas y poco fiables además su estructura amorfa no permite su identificación en técnicas como la difracción de Rayos - X (Hon y Shiraishi, 2000).

Dependiendo del tipo de planta la hemicelulosa se encuentra compuesta de diversos monosacáridos lineales de alto peso molecular en diferentes concentraciones. Por ejemplo en las coníferas están formadas principalmente por manosas y algunas xilosas mientras que en las frondosas la hemicelulosa está compuesta por xilosas y muy pocas manosas (Hon y shiraishi, 2000). La GAK al igual que los bambúes es considerada una conífera por lo que la composición de su hemicelulosa está representada en su 95 % por xilosa.

Existen diferentes tipos de hemicelulosa presentes en las maderas, las más comunes hemicelulosas son la O-acetil<sub>4</sub>-O metilglucoronoxilano y las galactoglucomananos. Estos dos tipos de hemicelulosa difieren en sus unidades estructurales. La Figura 2-7 muestra la estructura para los dos tipos principales de hemicelulosa encontradas en la madera.

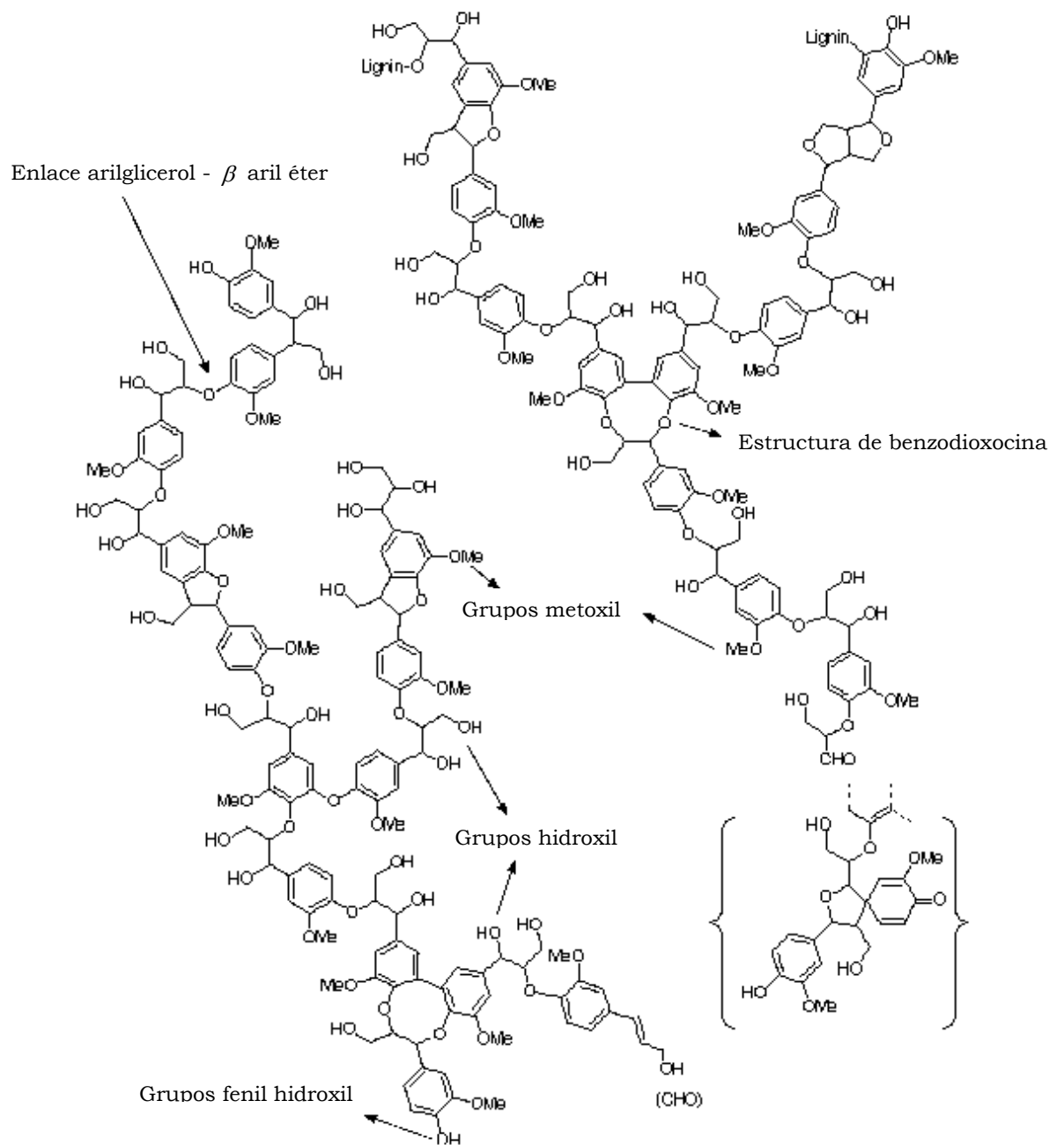




**Figura 2-7 Representación esquemática de las moléculas de hemicelulosa más comunes en la madera.**

### *Lignina*

Es un polímero aromático en su mayoría insoluble, muy resistente a la hidrólisis y por lo tanto no digerible por las enzimas animales, pero algunas bacterias y hongos segregan algunas enzimas capaces de degradarla, aunque los detalles de la biodegradación de la lignina aún no se tienen bien entendidos. Además no se ha podido aislar todas las partes de la lignina sin generar cambios estructurales. La lignina se encuentra entre los polímeros naturales más complejos de alto peso molecular (Urquiza, 2009). Los enlaces que predominan en la estructura de la lignina son del tipo éter principalmente  $\beta$  aril éter y entre los principales grupos funcionales que aportan diferentes características a esta molécula están: los grupos fenolitos libres, grupos hidroxil, metoxil, hidroxil benzilicos y grupos carbonilos (Martínez, *et al.*, 2001). Dependiendo de la fuente de la lignina estos grupos funcionales se presentan en diferentes concentraciones. La Figura 2-8 muestra el modelo de la molécula de lignina con sus grupos funcionales.



Fuente: Palonen, 2004

**Figura 2-8 Molécula de lignina**

La lignina es uno de los componentes esenciales de la planta y tiene como función llenar los espacios entre las paredes de la planta confiriéndole

resistencia mecánica a las paredes celulares y por extrapolación a toda la planta (Chabannes, *et al.*, 2001).

### **Fibra Soluble**

La fibra soluble es aquella capaz de ser disuelta en agua. Dentro de la fibra soluble encontramos varios compuestos principalmente, gomas pectinas y mucilagos. Además en esta clase de plantas también podemos atribuir el contenido de fibra insoluble a ciertas hemicelulosas y a cierta cantidad de lignina.

### **Carbohidratos**

Los carbohidratos se encuentran formados por unidades estructurales de azúcares y se pueden clasificar según el número de unidades de azúcares presentes en la molécula. Dentro de los principales carbohidratos presentes en las plantas encontramos el almidón cuyo tamaño y forma varía según la planta de la cual provenga (Tester, *et al.*, 2004).

#### *Almidón*

El almidón es un carbohidrato polimérico conformado por unidades de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos, es el carbohidrato más abundante de la naturaleza y está presente en distintas concentraciones en diferentes plantas. La concentración del almidón en la planta está asociada a la estación climática, aunque aún no se tiene un patrón definido entre la abundancia o escasez de las reservas de almidón (Barajas, *et al.*, 1997). El camino metabólico de formación de carbohidratos en los árboles está bien estudiado (Kramer y Kozlowski, 1960; Kozlowski y Keller 1966; Ziegler, *et al.*, 1974; Kozlowski, 1984) y es bien sabido que estos utilizan gran parte de estos carbohidratos en las funciones de crecimiento tanto axial como radial y otras porciones son usadas en la respiración, la floración y formación de frutos (Hon y Shiraishi, 2000)

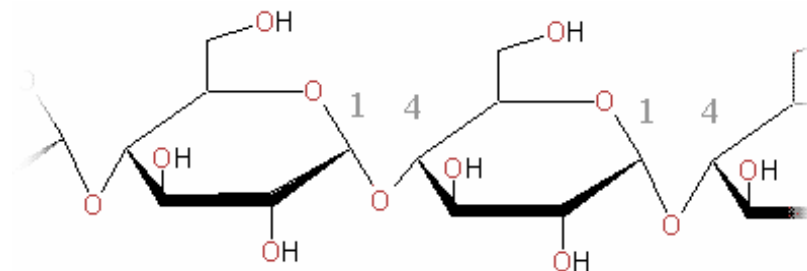
El almidón se acumula en forma de gránulos en las estructuras celulares de los vegetales, la forma y tamaño de los gránulos es característica de cada especie presentando grandes variaciones en sus

tamaños (1 -100 $\mu$ m de diámetro), forma (redondos, lenticulares, poligonales), distribución de tamaño (uni- o biomodales), grados de asociación (gránulos individuales o conglomerados de gránulos), composición (humedad, lípidos, proteínas y minerales), todas estas variaciones reflejan el origen botánico del almidón (Tester, *et al.*, 2004) y es una característica útil que puede ser empleada como método de identificación de especies de maderas y bambúes

Los gránulos de almidón son generalmente formados por capas sucesivas de dos  $\alpha$ -glucanos la amilosa y la amilopectina (Banks y Muir, 1980), los cuales representan el 98-99% del peso del almidón seco, ambas poseen propiedades físicas y químicas muy diferentes. Las propiedades generales de los diferentes tipos de almidón son función, al menos parcialmente de las proporciones de estos dos componentes, los almidones ricos en amilosa, por su capacidad de entrecruzamiento pueden producir películas comestibles para recubrir piezas de alimentos y alargar su vida útil (Lourdin, *et al.*, 1995).

### *Amilosa*

La amilosa tiene una estructura lineal desordenada que al enfriarse se asocia por puentes de hidrogeno en un retículo que se forma en forma de gel (Primo, 1998). La Figura 2-9 muestra la molécula de amilosa lineal, formada por unidades de glucosa unidas mediante el enlace  $\alpha$ 1-4 ó glucosídico (Urquiza, 2009).

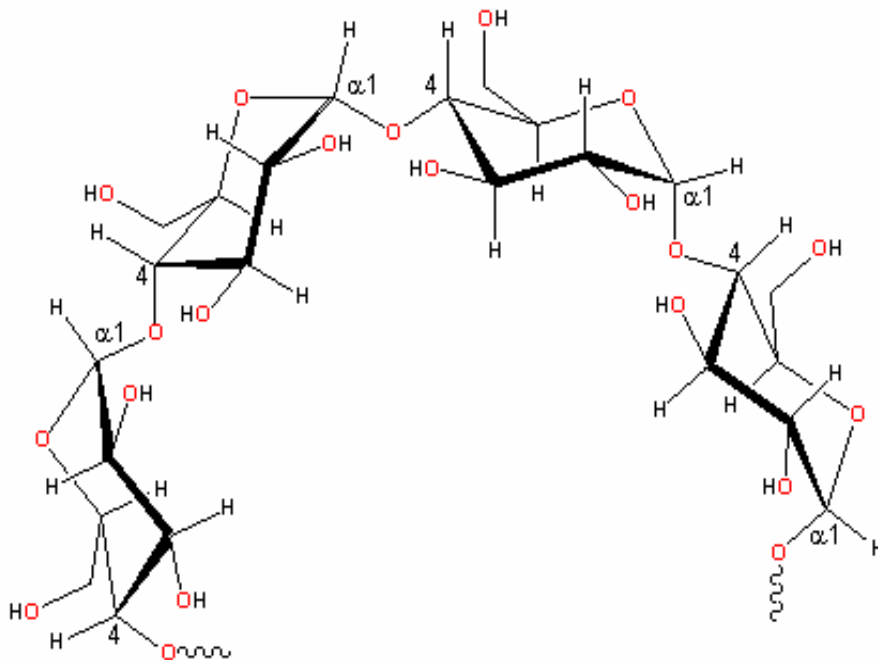


**Figura 2-9 Molécula lineal de Amilosa**



La amilosa al ser una estructura lineal tiene la capacidad de formar estructuras helicoidales con seis unidades de glucosa por cada giro de la hélice como se muestra en la Figura 2-10, dentro de esta estructura helicoidal la amilosa solo contiene átomos de hidrógeno, de ahí que pueda retener sustancias lipídicas en su interior, razón por la cual la solubilidad en el agua de la amilosa es reducida, mientras que en el exterior de la hélice se encuentran los grupos hidroxilos. Las cadenas helicoidales de la amilosa forman estructuras cristalinas

El peso molecular de la amilosa como su grado de polimerización varía dependiendo de la fuente del almidón.

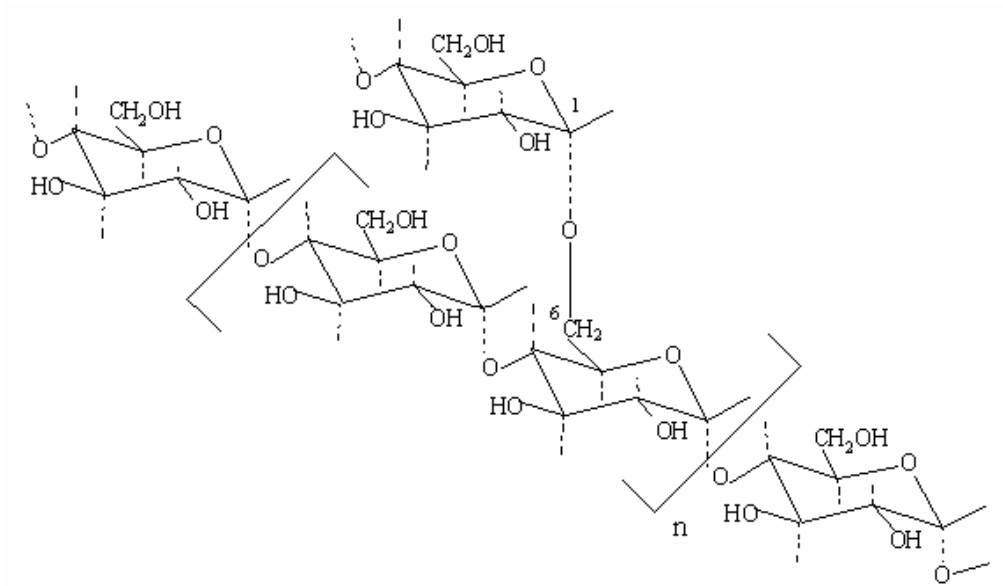


**Figura 2-10 Estructura helicoidal de molécula de amilosa**

### *Amilopectina*

La amilopectina es el segundo tipo de molécula que posee el almidón, también formada por unidades de glucosa. A diferencia de la amilosa que es lineal esta posee una estructura ramificada poco apta para la formación de redes moleculares, tiene poca tendencia a la retrogradación, sus soluciones

calientes al enfriarse se hacen viscosas a diferencia de la amilosa (Urquiza, 2009). La molécula de amilopectina se puede ver en la Figura 2-11.



**Figura 2-11 Molécula de amilopectina**

En la molécula de amilopectina también se encuentra unida por enlaces  $\alpha$ 1-4 o glucosídicos, excepto en los puntos de ramificación en donde las moléculas de glucosa se enlazan mediante enlaces  $\alpha$ 1-6 o enlaces O-glucosídicos. Las ramificaciones de la amilopectina cuentan con un elevado número de cadenas que difieren en su longitud y estas ramificaciones se presentan aproximadamente cada 24 o 30 moléculas de glucosa (Urquiza, 2009).

El peso molecular de la amilopectina es más alto que el de la amilosa igual que su grado de polimerización. La orientación de grupos OH dentro de las cadenas de amilopectina es más accesible para el agua, lo que le da una solubilidad mayor que la de la amilosa (Urquiza, 2009).

## 2.4 Propiedades Mecánicas del Bambú

La determinación de las propiedades mecánicas en los diferentes materiales tiene como objetivo principal establecer todas las funciones de control de calidad antes de su aprovechamiento.

Las características mecánicas de los materiales orgánicos como la Guadua se ven afectadas por diversos factores externos como el clima, suelo, ubicación, edad de crecimiento, tiempo de cosecha, humedad relativa, entre otras. En el caso de la GAK también existen diferencias en las propiedades mecánicas medidas en su dirección axial (cepa, basa y sobrebasa) y su dirección radial (Chauhan, 2000).

Las características mecánicas del bambú y de la madera se han comparado con las del acero y es posible encontrar algunas comparaciones.

Cada tallo de GAK es diferente, razón por la cual es difícil encontrar un patrón entre la geometría (diámetro, espesor y longitud) y su respuesta. Teniendo en cuenta que la GAK es un material anisotrópico, la caracterización de sus propiedades mecánicas debe hacerse referida a una posición en el culmo específica.

La edad de los culmos de bambú es una de las características que más afecta las propiedades mecánicas de la planta. Zhou (1981) reportó que la resistencia decrece en los culmos más antiguos, otros estudios realizados en bambúes específicos encontraron que los valores máximos de resistencia se presentan en culmos entre los 3 a 6 años (Limaye, 1948; 1952; Sekhar, *et al.*, 1962). Además las propiedades físicas del bambú al igual que el de las maderas esta fuertemente ligado a la cantidad de agua que contienen, esta dependencia con la cantidad de humedad es observable cuando se utiliza la planta en algunas aplicaciones particulares como procesos químicos industriales o productos alimenticios.

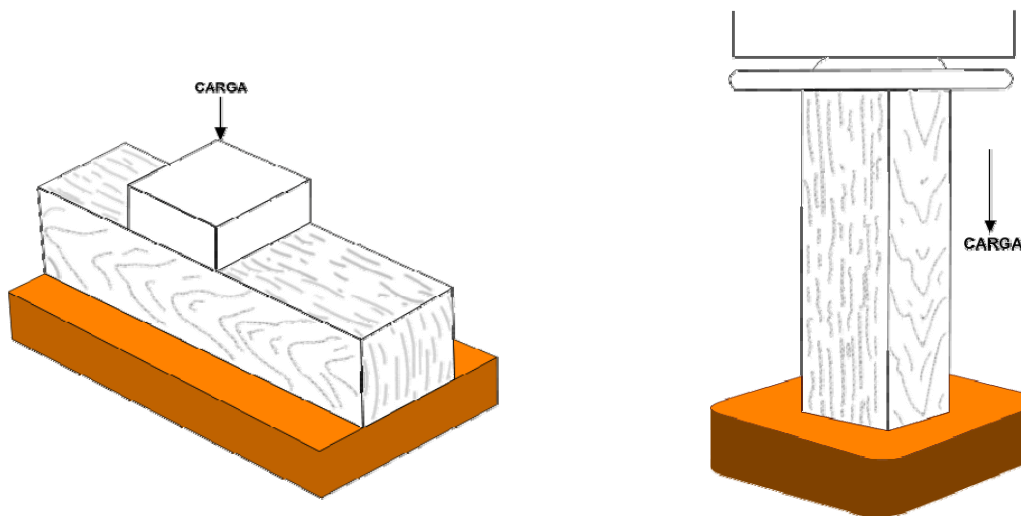
La resistencia mecánica de los materiales aumenta de manera significativa cuando al material se le da forma de fibra fina; en algunos casos, este aumento supera el factor de 10. Por otro lado, cuando las fibras son incorporadas en una matriz dúctil, estas soportan la mayor parte de las cargas al ser protegidas contra la fractura por dicha matriz circundante, a esta clase de materiales se les conoce como composito fibroso (Guy, 1980).

Al ser la GAK clasificada como un material compuesto natural, el cual presenta las características típicas de un composito fibroso, las propiedades mecánicas que presenta frente a otros materiales son superiores. Además, la GAK presenta una ventaja ante otros materiales compositos fibrosos. Esta ventaja se da debido a la alineación longitudinal de las fibras de celulosa en su culmo lo que le proporciona mayor rigidez en esta dirección (Ghavami, *et al.*, 2003).

La GAK se ha observado en términos de ingeniería con la posibilidad de ser utilizado de manera estructural, en columnas, vigas y armaduras (Ludovico, *et al.*, 2007). Para este aprovechamiento de la GAK, es necesario tener en cuenta ciertas propiedades las cuales le darán las mejores características. La resistencia a la compresión y la resistencia a la flexión aparecen como los dos ensayos más importantes a evaluar en la GAK para su utilización como material estructural.

#### **2.4.1 Ensayos de compresión**

En ingeniería los ensayos de compresión se definen como ensayos técnicos para determinar la resistencia de un material o su deformación ante un esfuerzo de compresión. En esta clase de ensayo se le ejerce a la probeta una fuerza perpendicular a la fibra o paralela a la fibra y se detecta la variación en la deformación. La Figura 2 -12 muestra el esquema de un ensayo de compresión perpendicular y paralela a la fibra.



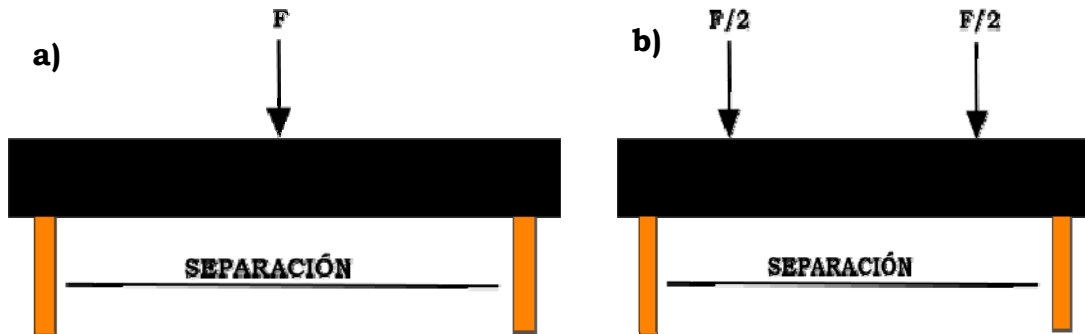
**Figura 2-12 Ensayos de compresión perpendicular a la fibra y ensayo de compresión paralelo a la fibra.**

Por lo general, los ensayos de compresión son aplicados a hormigones y metales aunque puede ser realizado a cualquier tipo de material, no obstante, para muchos materiales no altamente resistentes, los ensayos de compresión son más difíciles y complejos que los normales de tracción. Además es necesario tener en cuenta los efectos de rozamiento entre las superficies de las probetas y las superficies de la máquina de ensayos, ya que este rozamiento tiende a modificar los resultados (De Garmo, *et al.*, 1994). La elección entre un ensayo de compresión o de tracción la determina en su mayor parte el tipo de servicio que se le a solicitar al material. Para el caso de la GAK es más adecuado medir su resistencia por medio de ensayos de compresión, debido a su alta resistividad, anisotropía y distribución no homogénea de las fibras, dificultaría la fabricación de probetas para un ensayo de tracción.

#### **2.4.2 Ensayos de Flexión**

El ensayo de flexión puede ser llevado a cabo en diferentes materiales, generalmente involucra un material con una sección transversal rectangular y se encuentra soportado en sus extremos. A este material se le aplica una carga verticalmente, ya sea en un punto o dos y se conocen como flexión en

tres puntos o en cuatro puntos (Schmid, 2002). La Figura 2-13 muestra el esquema de un ensayo de flexión en tres y cuatro puntos.



**Figura 2-13 Ensayo de flexión en tres puntos (a) cuatro puntos (b).**

Los resultados del ensayo de flexión son similares a las curvas de esfuerzo-deformación, la diferencia está en que en estos ensayos se gráfica el esfuerzo en función de la deflexión y no en función de la deformación unitaria (Askeland y Phulé, 2004).

En muchos materiales, incluida la *GAK* se hace difícil aplicar el ensayo de tensión convencional a causa de la presencia de imperfecciones en la superficie, ya que con solo poner el material en las mordazas de las máquinas de ensayos de tensión se producen fracturas o deslizamientos. Estos materiales que presentan dificultad para la preparación de las probetas es recomendable probarlas con ensayos de flexión (Askeland y Phulé, 2004).

---

# Capítulo 3

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3-1 Descripción de las muestras

#### 3-1.1 Obtención de las muestras

Las diferentes muestras usadas en el desarrollo de este trabajo provienen de la reserva natural “El ocaso” entre los municipios de Montenegro y Quimbaya a 17 Km. de la ciudad de Armenia, Quindío en la región central de Colombia, a una altura geográfica de 1,300 m sobre el nivel del mar. Todos los especímenes pertenecen al género *Guadua* especie *Angustifolia* Kunth. Debido a la diversidad que este género presenta en Colombia, el estudio se centró en la caracterización fisicoquímica de cuatro de las variedades más utilizadas en la región, reconocidas y clasificadas taxonómicamente en la bibliografía disponible. Las variedades de GAK analizadas fueron: Rayada Amarilla, Castilla, Cebolla y Macana, todas ellas recolectadas entre febrero de 2007 y junio de 2008.

#### 3-1.2 Descripción de las muestras

En el capítulo 2 se describió que en el culmo de la *Guadua* se pueden encontrar varios fragmentos identificados y clasificados según la altura de la cual provienen. Los especímenes utilizados para este trabajo son entrenudos de la parte basa (parte inferior del culmo) de cada *Guadua*. Además, debido a que el tiempo de vida es un factor influyente en los resultados de caracterización, los especímenes analizados tienen diferente periodo de crecimiento, los recolectados en febrero de 2007 fueron clasificados a lo largo del desarrollo de este trabajo como especímenes maduros (4 años de

crecimiento). Por otra parte, los especímenes recolectados en junio de 2008 fueron clasificados como especímenes jóvenes (2 años de crecimiento). Únicamente se tuvieron en cuenta estos dos periodos de crecimiento, debido a que antes de los 2 años la *Guadua* se encuentra en su fase de retoño y no es muy útil para aplicaciones en construcción y después de 4 años de crecimiento se considera una *Guadua* sobremadura, la cual ha perdido parte de su resistencia mecánica y es una *Guadua* frágil y quebradiza, no apta para aplicaciones que requieran esfuerzos mecánicos.

### **3-1.3 Preparación de las muestras**

Para prevenir el ataque de insectos, mejorar las condiciones de uso, reducir el peso de las piezas y hacer más fácil su manipulación fue necesario reducir el contenido de humedad de la planta. Es posible reducir el contenido de humedad de las muestras por diversos métodos naturales, como secado al aire, protegidos del sol y la lluvia y por métodos artificiales como secado en estufas o cámaras cerradas similares a las usadas en madera aserrada. La reducción del contenido de humedad de las muestras es un factor importante en los resultados. Los análisis efectuados con base a un peso seco, disminuyen los errores externos (NREL 2005).

Todos los especímenes utilizados para este estudio se secaron artificialmente en un horno convencional por un periodo de 24 h a una temperatura de 45 °C alcanzando humedades relativas <10 %, para evitar la proliferación de microorganismos. Además, es importante resaltar que los especímenes utilizados no se encuentran sometidos a ningún proceso de impermeabilización. El tamaño y forma de los especímenes estuvo sujeto a cada uno de los análisis realizados.

## **3-2 Caracterización Química**

La caracterización química realizada a los especímenes de bambú estuvo dividida en dos partes: análisis composicional, donde se calcula la cantidad de componentes químicos, lignina, celulosa, hemicelulosa, humedad,



cenizas presentes en el material y determinación de fibra, en donde se incluye la fibra soluble e insoluble de cada espécimen.

El análisis composicional fue llevado a cabo en Audubon Sugar Insitute, en la ciudad de Baton Rouge, Louisiana EEUU. Todos los procedimientos para la determinación del análisis composicional están basados en los métodos del Laboratorio Nacional de Energía Renovable o por sus siglas en inglés NREL (National Renewable Energy Laboratory). Previo a la determinación de carbohidratos estructurales como celulosa y hemicelulosa, fue necesario realizar una extracción de compuestos solubles en agua y alcohol. La muestra obtenida después de este proceso se conoce como muestra libre de extractos y se utiliza para los análisis de lignina y cabohidratos estructurales.

El desarrollo de los análisis composicionales de las variedades de GAK se basa en el contenido total de sólidos y por ende en el contenido de humedad. El porcentaje total de sólidos esta expresado como:

$$\% \text{ Sólidos Totales} = \frac{W_{\text{biomasa sec } a}}{W_{\text{biomasa sin sec ar}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Donde:

$W_{\text{biomasa sec } a}$  = Peso constante de la muestra después de ingresar al horno.

$W_{\text{biomasa sin sec ar}}$  = Peso de la muestra molida.

### 3-2.1 Determinación de extractivos

La determinación de extractivos presentes en la muestra es un proceso fundamental para dar inicio a las siguientes etapas del análisis composicional. Esta determinación se debe realizar en todos los especímenes, no llevar a cabo esta extracción puede dar como resultado un falso valor en el contenido de los componentes químicos. Todos los elementos utilizados en la determinación de los extractivos deben estar

debidamente secados y haber alcanzado peso fijo, en todos los procedimientos utilizados donde se deba alcanzar un peso constante se debe tener una variación en el peso mínima de 0.01%. Es importante tener en cuenta que la humedad del ambiente modifica el peso tanto de las muestras como de los aparatos a utilizar. Por lo anterior, es importante dejar el mismo lapso de tiempo las muestras y materiales a utilizar dentro del desecador, hasta que alcancen temperatura ambiente antes de ser pesados, asegurando que la humedad que puedan ganar sea la misma en todos los pesajes. Para el desarrollo de este trabajo, todos los materiales y muestras que debían alcanzar su peso fijo, se colocaron 40 min en desecadores hasta alcanzar la temperatura ambiente después de haber sido retiradas de los hornos.

#### *Preparación de la muestra*

La preparación para este análisis consiste básicamente en el secado de las muestras a utilizar, hasta que alcancen una humedad por debajo del 10 %. Este secado se realiza mediante el uso de un horno convencional a  $195 \pm 3$  °C. Las muestras son molidas en un molino de café convencional (*Smart Grind Black & Decaer*) y colocadas en un Rot ap (FRITSCH ANALYSETTE 3 PRO) como el que se muestra en Figura 3-1 durante 15 minutos, con las mallas 20 (850 $\mu$ m) y la malla 80 (800 $\mu$ m) serie USA.



**Figura 3-1 Tamizador (FRITSCH ANALYSETTE 3 PRO) utilizado en la preparación de los especímenes para los análisis químicos**

Transcurridos 15 minutos se recolecta la muestra retenida en la malla 80, la muestra que pasa a través de esta malla (800  $\mu$ m) es desechada, mientras que la que queda retenida en la malla 20 (850  $\mu$ m) se puede volver

a moler y tamizar para obtener más muestra. El tratamiento para la preparación de muestras antes del análisis composicional utilizado en el desarrollo de este trabajo es el secado en horno convencional y los detalles están expuestos en el método NREL/TP-510-42620 Método B (Anexo 1).

Antes de comenzar con la determinación de extractos es necesario obtener el peso de la muestra seca ODW que se calcula mediante la ecuación 3.2.

$$ODW = \frac{W_{a.e}}{100} \times \% \text{Total de sólidos} \quad \text{(Ec. 3.2)}$$

Donde:

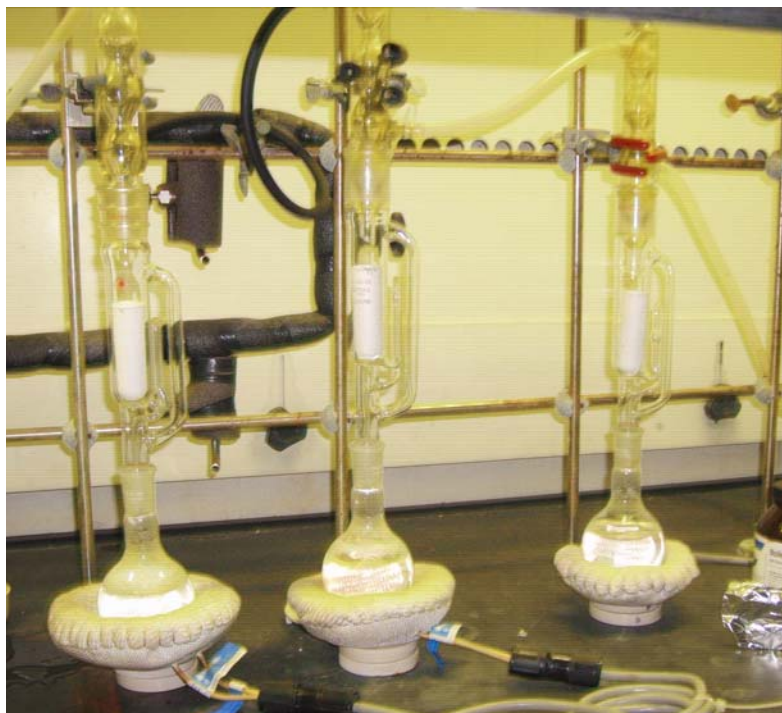
$W_{a.e}$  = Peso de la muestra antes de la extracción.

ODW= Oven Dry Weigth.

#### *Desarrollo de la prueba*

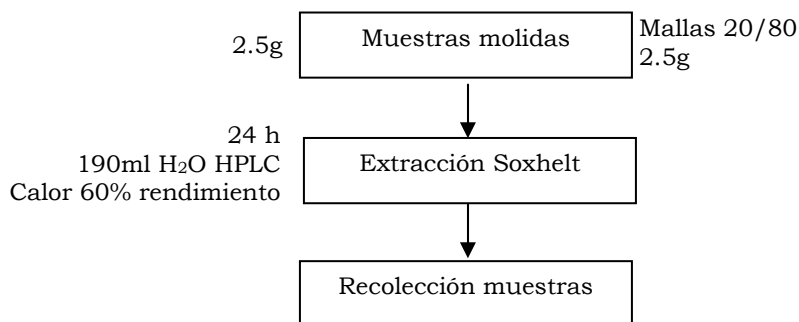
La determinación de extractivos consta de dos pasos: una primera extracción en agua, en donde se obtienen todos los extractos solubles en agua y una segunda extracción en alcohol en la cual se obtiene las sustancias solubles en alcohol. La cantidad de muestra utilizada depende de los análisis y repeticiones que se vayan a realizar posteriormente con la muestra libre de extractos. En el desarrollo de este trabajo se utilizaron 2.5 g de cada muestra antes de empezar su extracción.

Los detalles para la determinación de extractivos tanto de agua como de etanol están condensados en el método NREL/TP 510-42619 (Anexo 2). Primero se realiza la extracción en agua y posteriormente la extracción en alcohol. El montaje ambas extracciones se puede observar en la Figura 3-2.



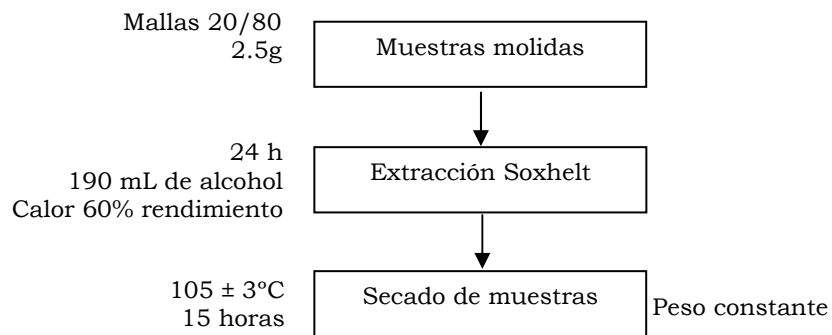
**Figura 3-2 Montaje para la extracción de Agua y Alcohol**

Un diagrama de bloques resumido para la determinación de extractos en agua se muestra en la Figura 3-3.



**Figura 3-3 Esquema para la extracción en Agua**

Una vez concluida la extracción en agua, se recolecta muestra de la solución para el análisis en el HPLC, posteriormente se realiza el mismo montaje para la extracción de los extractos solubles en alcohol, los detalles experimentales de este procedimiento se encuentran en el método NREL/TP 510-42619 (Anexo 2). Un diagrama de bloques para la extracción en alcohol se encuentra resumido en la Figura 3-4.



**Figura 3-4 Esquema para la extracción en Alcohol**

Después de la evaporación del alcohol, los extractos solubles se adhieren a las paredes del matraz. Una vez obtenido el peso constante en los matraces se calcula el contenido de extractos solubles en alcohol por medio de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Extractivos} = \frac{W_{m+s} - W_m}{ODW} \times \frac{200\text{mL}}{190\text{mL}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Donde:

$W_{m+s}$  = Peso del matraz con la solución de la extracción.

$W_m$  = Peso constante del matraz.

$ODW$  = Peso de la muestra seca.

Los extractivos están compuestos de moléculas pequeñas, que provienen de las sustancias de protección que los árboles segregan como taninos o resinas y del metabolismo de las células vivas: proteínas, azúcares, esteroides, entre otros. Los extractivos obtenidos después de la primera extracción son utilizados en la determinación de azúcares por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) por sus siglas en inglés. Para llevar estos extractos al análisis en el HPLC se debe rectificar el

contenido de agua a 190 ml razón por la cual aparece un factor de corrección en la Ec. 3.3 descrita anteriormente.

### **3-2.2 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina**

Los carbohidratos estructurales son carbohidratos poliméricos llamados celulosa y hemicelulosa. Para la determinación de estos carbohidratos y lignina es necesario tener la muestra libre de extractos (NREL 2008).

#### *Preparación de la muestra*

Las muestras utilizadas en la determinación de carbohidratos y lignina corresponden a la muestra libre de extractos, provenientes de las extracciones con agua y alcohol, conocidas como muestra libre de extractos.

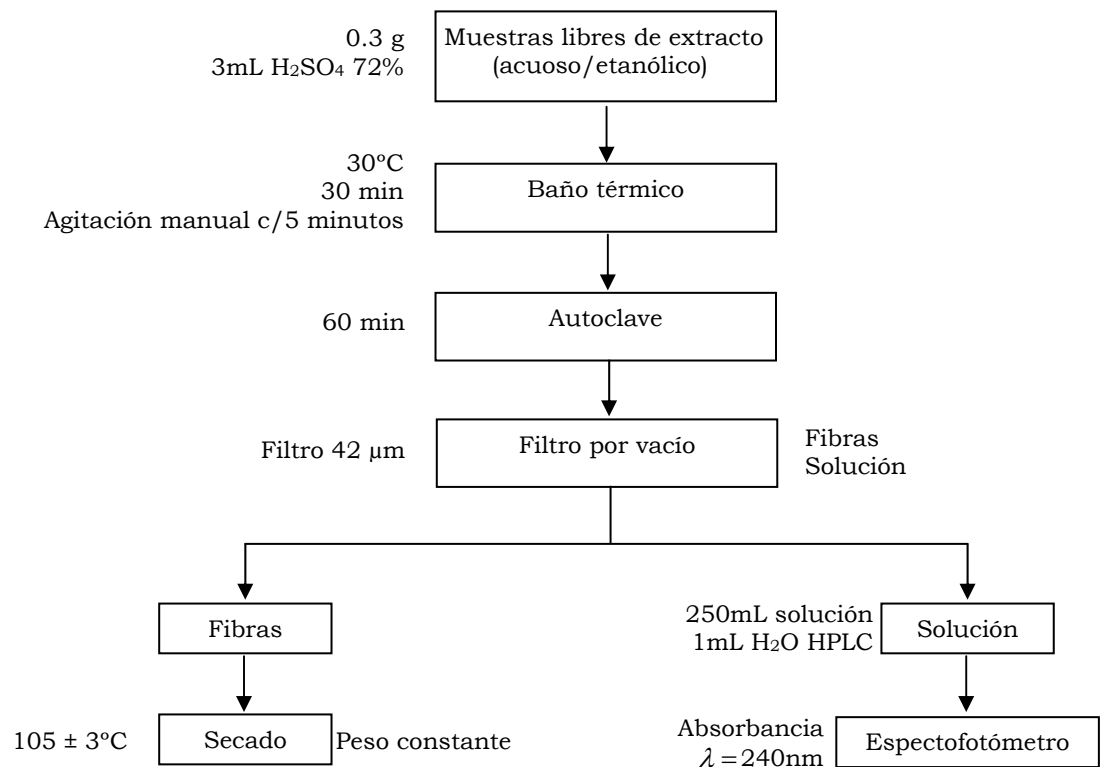
#### *Desarrollo de la prueba*

Se tomaron dos muestras y se analizan simultáneamente. La primera se lleva al horno (Precision compact laboratory oven, 1.7 cu. Ft. Mechanical oven) a  $105^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$  para determinar el contenido de humedad antes de comenzar la determinación de los carbohidratos estructurales y realizar los cálculos que se basan en este dato.

Por otro, lado se toma otra muestra la cual se hidroliza con el objetivo de calcular los componentes químicos fundamentales presentes en la Guadua: lignina, celulosa y hemicelulosa. La hidrólisis ácida se realiza para descomponer las moléculas de celulosa y hemicelulosa en sus formas monoméricas. Para esta determinación se utilizó ácido sulfúrico al 72 % de pureza con una densidad de 1.6338 g/mL. Los detalles experimentales para este procedimiento se encuentran en el método NREL/TP-510-42618 (Anexo 3). El diagrama de bloques que se muestra en la Figura 3-5 resume el procedimiento para la realización de la hidrólisis.

Los datos obtenidos del espectrofotómetro se utilizan para la determinación del contenido de lignina presente en cada muestra.

De la solución filtrada se utiliza la parte restante para la determinación de carbohidratos estructurales en el HPLC y las fibras filtradas se llevan al horno hasta que alcancen peso constante para después ser utilizadas en la determinación del contenido de cenizas.



**Figura 3-5 Esquema resumido de la hidrólisis para la determinación de Carbohidratos estructurales y lignina**

### **Contenido de Lignina**

Para la determinación de lignina, compuesto que forma parte fundamental de la composición de la *Guadua*, existen diferentes métodos, este procedimiento se basa en el método NREL/TP 510-42618 (Anexo 3).

### *Preparación de la muestras*

Las muestras utilizadas provienen de la solución filtrada después de la hidrólisis, estas muestras deben ser analizadas en las siguientes seis horas después de la hidrólisis. Si no es posible hacer la determinación de la

lignina en este periodo de tiempo, se deben llevar las muestras a refrigeración máximo por dos semanas.

*Desarrollo de la prueba.*

La solución que se obtiene de la hidrólisis es llevada a un espectrofotómetro GENESYS 10 UV/Vis en el método de absorbancia trabajando en  $\lambda = 240$  nm, y con un blanco de calibración de agua destilada. La Figura 3-6 muestra el espectrofotómetro utilizado para estos análisis del laboratorio de ASI Louisiana USA.



**Figura 3-6 Espectrofotómetro utilizado en la determinación de lignina**

Los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro se combinan con los resultados en el contenido de cenizas para realizar la determinación del porcentaje de lignina.

Las mediciones están basadas en el contenido de sólidos, por esta razón antes de la hidrólisis se toma una muestra representativa con peso constante y se calcula el porcentaje total de sólidos. Con este contenido de sólidos se calcula el peso de la muestra seca  $ODW$  (ecuación 3.4)

$$ODW_{AH} = \frac{W_{MS} \times \% \text{Total de sólidos}}{100} \quad \text{(Ec. 3.4)}$$

Donde

$ODW_{AH}$  = Peso de la muestra seca antes de la hidrólisis.



$W_{MS}$  = Peso de la muestra que se utilizó para realizar la hidrólisis.

La cantidad de lignina se calcula basada en el peso constante de la muestra, la absorbancia reportada por el espectrofotómetro y el contenido de cenizas, además es necesario calcular el porcentaje de residuos ácidos insolubles (AIR), es decir la cantidad de sólidos que se tienen después de la hidrólisis, para obtener el porcentaje de residuos ácidos insolubles se usa la ecuación 3.5:

$$\% AIR = \frac{W_{\text{residuos insolubles solidos}}}{ODW_{\text{muestra antes de hidrólisis}}} \times 100\% \quad (\text{Ec. 3.5})$$

Donde:

$AIR$  = Residuos ácidos insolubles.

$ODW_{AH}$  = Peso de la muestra seca antes de la hidrólisis.

$W_{AIR}$  = Peso de residuos insolubles sólidos.

La lignina es un polímero complejo que tiene componentes solubles e insolubles, para determinar el contenido total de lignina es necesario calcular ambos componentes. El contenido del componente insoluble de la lignina involucra el contenido de cenizas y se puede obtener con la ecuación 3.6.

$$\% LI = \frac{W_{FS} - W_{CH}}{ODW_{\text{muestra antes hidrólisis}}} \times 100\% \quad (\text{Ec. 3.6})$$

Donde:

$\%LI$  = Porcentaje de lignina insoluble.

$W_{FS}$  = Peso constante de las fibras después de la hidrólisis.

$W_{CH}$  = Peso de las cenizas obtenidas de las fibras que se hidrolizaron.

Por otro lado, el componente soluble de la lignina se adquiere de la solución obtenida después de la hidrólisis. Esta solución se lleva al espectrofotómetro en triplicado para un promedio en la medición y se calcula su absorbancia. El porcentaje de lignina soluble es posible determinarlo mediante la ecuación 3.7.

$$\% LS = \frac{UV_{abs} \times V_{filtrado} \times Disolución}{\varepsilon \times ODW_{muestra\ antes\ hidrólisis}} \times 100\% \quad (\text{Ec. 3.7})$$

Donde:

$UV_{abs}$  = Promedio de absorbancia para las tres muestras a 240 nm.

$V_{filtrado}$  = Volumen utilizado para la filtración 87ml.

$$Disolución = \frac{\text{Volumen de la muestra} + \text{Volumen de disolvente}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

$\varepsilon$  = Absorbitividad de la biomasa en la respectiva longitud de onda (240nm).

Las disoluciones de la muestra se deben ajustar de manera que la absorbancia se encuentre entre 0.7 y 1.

En el caso de la *GAK* se determinó que la relación adecuada para alcanzar esta absorbancia está dada por 0.5 mL de solución obtenida después del proceso de hidrólisis y 0.75 mL del disolvente utilizado, en este caso agua HPLC. Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el estándar NIST-SRM Bagasse 8491 que es un material altamente fibroso y tiene una semejanza en la composición química con el bambú.

La Tabla 3.1 muestra los parámetros recomendados para el estándar utilizado en el desarrollo del trabajo.

**Tabla 3.1 Longitudes y absorbancias para estándar NIST 8491**

<b>Biomasa</b>	<b>Longitud de onda (<math>\lambda</math>) máxima (nm)</b>	<b>Absorbancia en <math>\lambda</math> máxima <math>\left(\frac{L}{g \cdot cm}\right)</math></b>	<b>Longitud de onda (<math>\lambda</math>) recomendada (nm)</b>	<b>Absorbancia en <math>\lambda</math> recomendada <math>\left(\frac{L}{g \cdot cm}\right)</math></b>
<b>NIST-SRM 8491</b>	198	40	240	25

Las longitudes de onda máximas a menudo presentan algunos tipos de interferencia. Las longitudes de onda recomendadas han sido escogidas para minimizar estas interferencias.

### **Contenido de Carbohidratos estructurales**

Los carbohidratos estructurales como se mencionó en el capítulo anterior hacen referencia a la celulosa y la hemicelulosa. A diferencia de la lignina, la hidrólisis de las muestras permite dividir las moléculas de estos carbohidratos en sus unidades monoméricas para tener una cuantificación porcentual del contenido de estos carbohidratos.

#### *Preparación de las muestras*

La solución obtenida después del proceso de hidrólisis se afora nuevamente a 87 mL con agua HPLC y se ajusta su pH entre 5 y 6 con ayuda de carbonato de calcio (Sigma Aldrich). La neutralización de la muestra debe hacerse cuidadosamente, adicionando lentamente carbonato de calcio en polvo y agitando la solución manualmente después de añadirlo. Se debe monitorear el pH constantemente; cuando se tenga un pH entre 5-6 se debe detener la adición de carbonato de calcio y suspender la agitación permitiendo que la muestra se decante. El pH de la solución antes del análisis debe ser de 7. Una alternativa para la decantación del carbonato de calcio, es la centrifugación de las muestras. Esto permite que el exceso de carbonato se precipite y se obtiene una solución para el análisis libre de partículas de gran tamaño que pueden obstruir la columna en el HPLC (High pressure liquid chromatography). Una vez que se ha precipitado el

exceso de carbonato de calcio, se filtran las muestras pasando a través de un filtro 0.2  $\mu\text{m}$ .

#### *Desarrollo de la prueba*

Las muestras después de que se les ajusta el pH se llevan al HPLC para poder determinar el contenido de carbohidratos estructurales en ppm.

La cromatografía líquida de alta presión o HPLC por sus siglas en Inglés (High Pressure Liquid Chromatography) es una clase de cromatografía generalmente usada en bioquímica y química analítica. Esta técnica se utiliza para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. El HPLC utilizado en la determinación de carbohidratos estructurales en el desarrollo de este trabajo fue un HPLC – VWD 1100 SERIES AGILENT TECHNOLOGIES con automuestrador (0.1-2.5 $\mu\text{l}$ ).

La Figura 3-7 muestra el HPLC utilizado en este trabajo el cual se encuentra en el laboratorio de procesos analíticos del Instituto del Azúcar de Audubon (ASI), ubicado en la ciudad de Baton Rouge, Louisiana Estados Unidos y perteneciente a LSU AgCenter extensión académica e investigativa de la Universidad Estatal de Louisiana.

La hidrólisis permite dividir la celulosa y hemicelulosa (azúcares poliméricos) en monómeros como glucosa y manosa, estos compuestos forman parte de los azúcares poliméricos C<sub>6</sub> como la celulosa y otros monómeros como xilosa y arabinosa componentes de azúcares poliméricos C<sub>5</sub> como la hemicelulosa.



**Figura 3-7 HPLC utilizado en la determinación de carbohidratos estructurales**

Algunas investigaciones han determinado que la xilosa es el principal componente de la hemicelulosa del bambú y sus propiedades se comparan con algunas propiedades de xilanos encontrados en maderas blandas y maderas duras (Maekawa, 1976). Por otro lado, también se conoce que el principal componente de la estructura de la celulosa proveniente del bambú es la glucosa (Farris *et al.*, 2008).

### **3-2.3 Contenido de Cenizas**

Las cenizas están constituidas por el residuo inorgánico después de que la materia orgánica se ha quemado en el horno (precision compact laboratory oven, 1.7cu. ft. Mechanical oven). Las cenizas no necesariamente deben tener la misma composición que la materia mineral presente en la muestra original debido a las posibles pérdidas por volatilización.

El procedimiento para la determinación de cenizas está reportado en diferentes métodos y no tiene muchas variaciones de un método a otro, solo es necesario someter las muestras a ciclos de temperatura dentro de muflas que aseguren la completa incineración (>500°C) de la materia orgánica.

### *Preparación de las muestras*

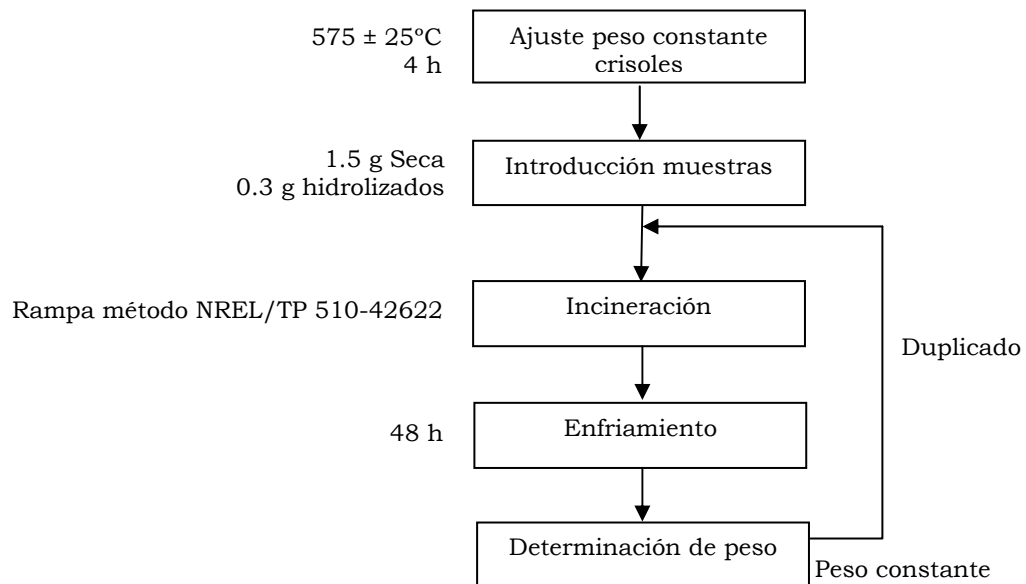
La determinación de cenizas se lleva a cabo a las muestras sin ningún tratamiento y a las muestras después de la hidrólisis.

Las muestras utilizadas para la determinación de cenizas sin ningún tratamiento son las que se obtienen después del secado en horno convencional a  $150 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta alcanzar una humedad por debajo del 10 %. Después son tamizadas y recolectadas de la malla 20/80  $\mu\text{m}$  serie USA.

Las muestras utilizadas para la determinación de cenizas son las obtenidas después del filtrado de la hidrólisis, una vez hayan alcanzado peso constante; por eso es necesario realizar la filtración de la hidrólisis en un filtro 42  $\mu\text{m}$  ashless, el cual es específico para aplicar en esta técnica porque se elimina al momento de la incineración sin dejar residuos.

### *Desarrollo de la prueba*

En el desarrollo de este trabajo se utilizó el método NREL/TP 510-42622 (Anexo 4). La Figura 3-8 muestra un diagrama de bloques del proceso para la determinación de cenizas. El procedimiento se hace en duplicado para obtener un valor promedio de las cenizas y asegurar que toda la materia orgánica es incinerada.

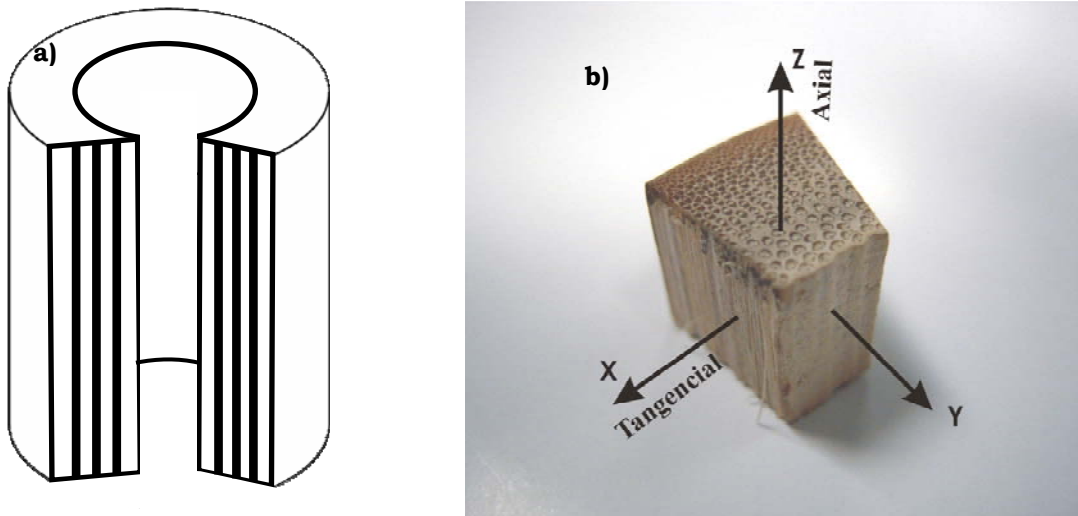


**Figura 3-8 Diagrama de bloques para la determinación de cenizas**

### 3-2.4 Contenido de Fibra

La determinación del contenido de fibra en los materiales se puede desarrollar por diferentes métodos. Es posible calcular el contenido de fibra cruda o total o calcular el contenido de fibra soluble e insoluble. El método de determinación de contenido de fibra utilizado en este trabajo es el 985.29 AOAC (2000) el cual se puede desarrollar con el Kit SIGMA ALDRICH DF 100A (Anexo 5). Este método permite la separación del contenido total de fibra en porcentaje de fibra soluble e insoluble. El contenido de ambas fibras, se determinó para especímenes jóvenes y maduros de la basa del culmo de las cuatro variedades de *Guadua* utilizados en el desarrollo de este trabajo.

La Figura 3-9 muestra las probetas a las cuales se les aplicó el método 985.29 AOAC 2000 para la determinación de fibra y muestra las direcciones definidas para los análisis posteriores.



**Figura 3-9** Culmo de *Guadua angustifolia* Kunth utilizados en la determinación de fibra soluble e insoluble a) Esquema de un culmo completo de la sección basal de la *Guadua*, se puede observar el diámetro interno y externo de este b) Sección obtenida del culmo de *Guadua*, en el cual se encuentran identificadas las principales direcciones de esta.

#### *Preparación de las muestras*

Cada uno de los especímenes a analizar, fueron molidos en un molino de café convencional marca CUISINART PG-13658-CAN y tamizados por la malla  $40\ \mu\text{m}$  obteniendo un polvo fino de cada una de las muestras. El método 985.29 AOAC (2000) hace referencia a la aplicación de tratamientos previos al análisis para muestras con altos contenidos de grasa. Para el caso de la *GAK* el contenido de grasa no es significativo, debido a que más del 90% de la composición de la *Guadua* es fibra (Scurlock, 2000; Ghavami, *et al.*, 2003) se prescinde de estos tratamientos.

#### *Desarrollo de la prueba*

La prueba para la determinación del contenido de fibra consta de varios pasos que combinan métodos enzimáticos y gravimétricos. Este análisis tiene una duración de tres días y utiliza tres enzimas la  $\alpha$ -amilasa termoestable, la proteasa y amiloglucosidasa las cuales descomponen los azúcares, las proteínas y otras sustancias orgánicas.



Para calcular el porcentaje del contenido de fibra de las muestras analizadas se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{w_f \times 100\%}{w_0} \quad \text{(Ec. 3.8)}$$

Donde:

$w_0$  = Peso inicial de la muestra en gramos.

$w_f$  = Peso de la muestra después del proceso de secado en gramos.

Para determinar el contenido de fibra soluble se utiliza el peso registrado después del primer filtrado y para determinar el contenido de fibra insoluble se utiliza el peso registrado después del segundo filtrado. La muestra un diagrama de bloques donde se resume el método para la determinación de fibra soluble e insoluble.

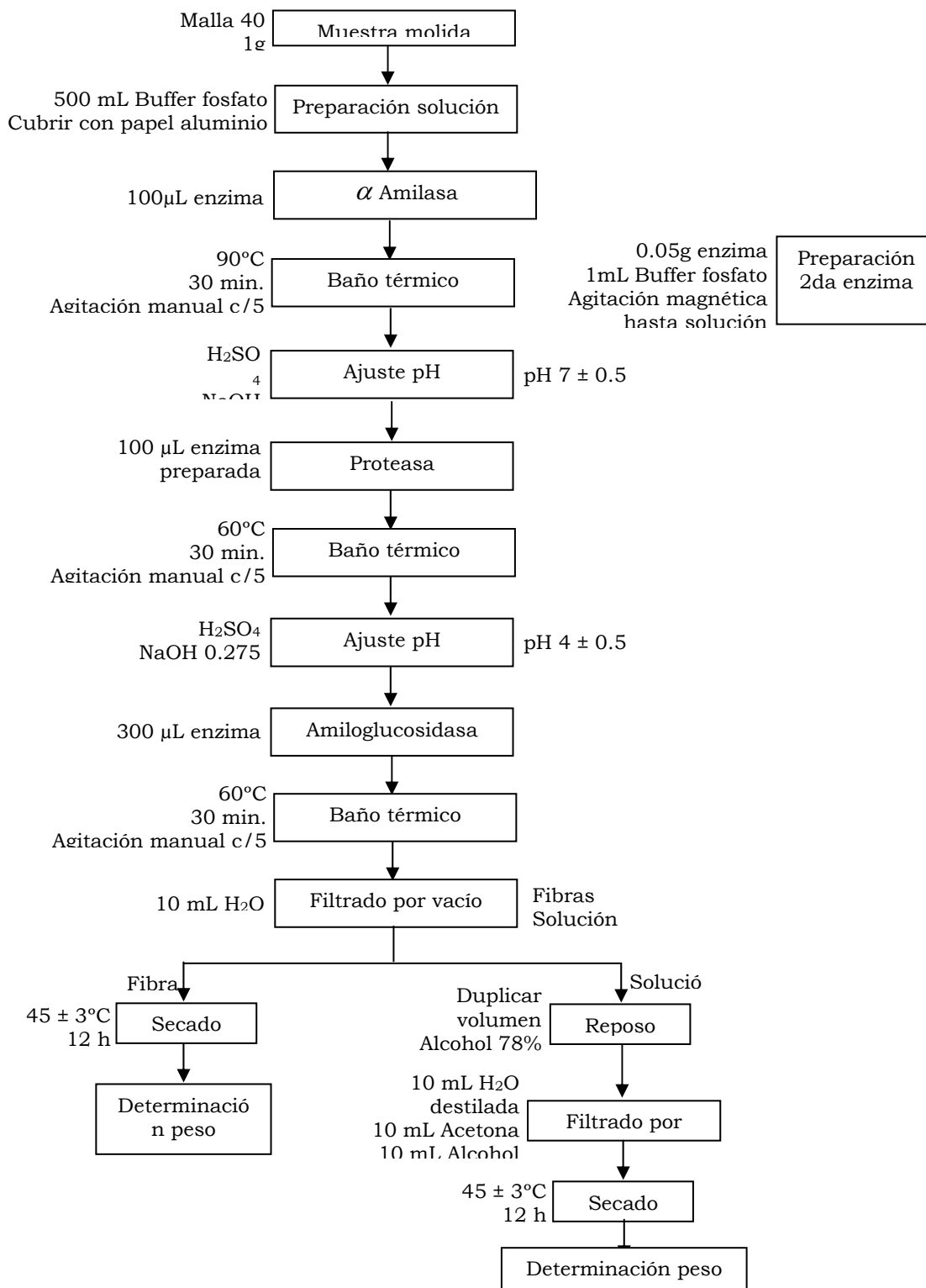


Figura 3-10 Diagrama de bloques para la determinación de fibras

### 3-2.5 Contenido de Humedad

Todas las muestras de biomasa contienen cierta cantidad de humedad, la cual puede cambiar rápida y significativamente mientras esta expuesta al aire. Los resultados de los análisis químicos típicamente se encuentran reportados en relación a la cantidad de humedad que está presente en la muestra. El proceso para determinar el contenido de humedad se lleva a cabo por medio de un secado convencional en horno sin degradación de materia orgánica y por diferencia de peso se obtiene el porcentaje de humedad de la muestra. A pesar de que se trata un procedimiento sencillo, existen otros procesos para la determinación de humedad en los que la determinación se realiza automáticamente mediante un analizador infrarrojo de humedad.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el método NREL/TP-510-42621 (Anexo 6) basado en ASTM E1756-01 y T412 om-02. Es importante tener en cuenta que este procedimiento no debe ser aplicado a aquellas muestras que sufren cambios químicos cuando se encuentran sometidos a calor, como ácidos o biomasa alcalina y para muestras muy viscosas es necesario utilizar otro método.

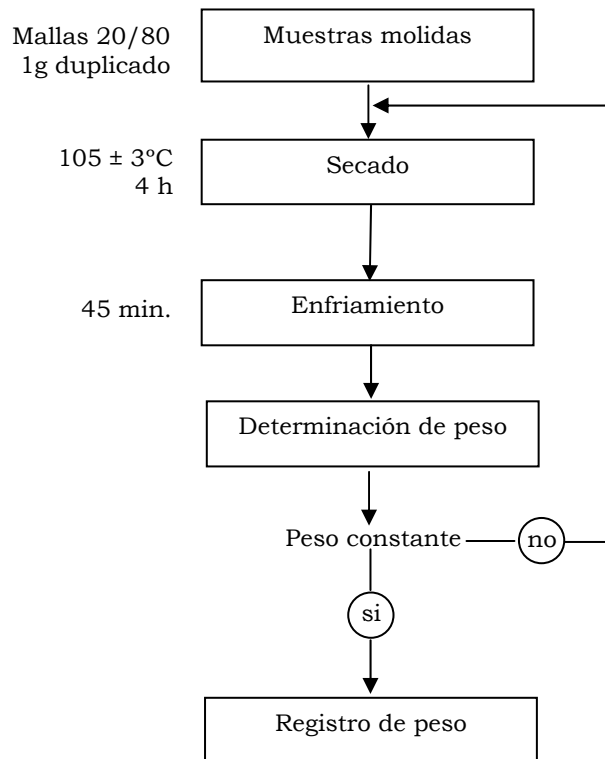
#### *Preparación de las muestras*

Las muestras que se utilizan en este análisis pueden estar preparadas de diferentes formas, pueden ser muestras libres de extractos (NRLE 2005), muestras secas molidas o en fracciones sólidas. Las muestras utilizadas en este análisis fueron secadas en horno a  $105^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar humedad relativa menor al 10% después se molieron en un molino de café convencional y por último fueron tamizadas durante 15 min. En un tamizador FRITSCHER con las mallas 20 y 80 serie USA, recolectando la muestra retenida sobre la malla 80 serie USA.

*Desarrollo de la prueba*

De la misma forma que en los análisis anteriores, fue necesario que los materiales a utilizar se encontraran a peso constante antes de comenzar el desarrollo de la prueba.

La Figura 3-11 muestra un diagrama de bloques para el método para la determinación del contenido de humedad.



**Figura 3-11 Diagrama de bloques para la determinación de humedad.**

Una vez que se obtiene un peso constante, por diferencia de peso entre la muestra inicial y la final se obtiene el contenido de humedad de la muestra.

### 3-3 Caracterización física

#### 3-3.1 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido o SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy) es una técnica que utiliza electrones en lugar de luz para formar imágenes. SEM permite la formación de imágenes con alta resolución permitiendo analizar características cercanas a la muestra con una alta magnificación. Esta técnica proporciona una vista general del culmo de bambú, superando las técnicas ópticas, alcanzando amplificaciones mayores y por ende con más detalle de las estructuras encontradas.

Debido a que la técnica utiliza electrones para formar las imágenes, es necesario que las muestras sean conductoras o se vuelvan conductoras por medio de un recubrimiento delgado de algún conductor, en la mayoría de los casos es oro o carbón. En esta técnica los electrones son acelerados dentro del cañón del microscopio por una diferencia de potencial de 1000 a 30000 Volts. Los voltajes de aceleración pequeños se utilizan para la observación de muestras biológicas sin preparaciones previas o muestras muy aislantes y los voltajes altos de aceleración se usan en metales debido a que no sufren ningún daño. Para el análisis de las muestras de *Guadua* se utilizaron voltajes de aceleración altos, debido a que se recubrieron con oro. Después de su aceleración los electrones salen del cañón y son enfocados por un juego de lentes, que hacen incidir en la muestra un haz de electrones lo más pequeño posible y obtener una alta resolución. Una vez que se tenga el haz se barre punto a punto la muestra. Los electrones incidentes producen diferentes interacciones con los átomos de la muestra, desprendiendo diferentes clases de radiación la más común es conocida como electrones secundarios y es con la que se realizaron las imágenes en este estudio.

### *Preparación de las muestras*

Los análisis de microscopía electrónica de barrido se realizaron en dos direcciones diferentes: la primera dirección denominada axial es la dirección de crecimiento de la planta, la segunda dirección denominada tangencial es un corte perpendicular al crecimiento de esta (ver Figura 2-1 en el capítulo 2).

Las herramientas para realizar los cortes en las muestras suelen dejar residuos y marcas. Para observar la morfología propia de la superficie de la *Guadua* fue necesario recurrir a un pulido por medio de papel abrasivo marca FANDELI con tres tamaños de grano diferentes (400, 600 y 1200  $\mu\text{m}$ ). Después del pulido de la superficie se remueve cualquier exceso de grano con aire y por último se procede a fijar las muestras en un porta muestras cilíndrico de bronce. La fijación entre el porta muestras y la muestra se hace por medio de una cinta de carbono, con el fin de garantizar que haya una conductividad eléctrica entre ambos. Una vez fijadas, se realiza la evaporación de una película delgada de un metal conductor. Para el desarrollo de este trabajo se realizaron 2 evaporaciones de 4min con oro.

### *Desarrollo de la Prueba*

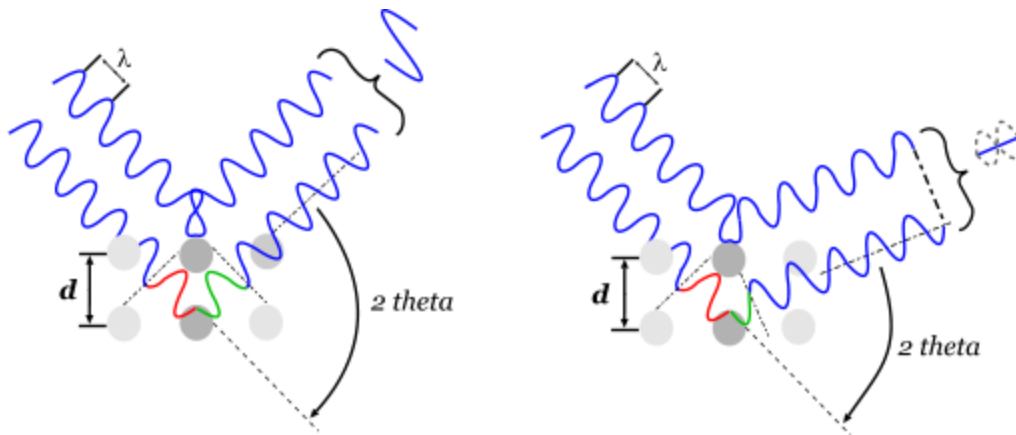
Los análisis de SEM se realizaron en un Microscopio Electrónico LV-SEM, JSM-6060LV con resolución de 3.5nm en alto vacío y 4.0nm en bajo vacío, con un voltaje de aceleración de 30 kV y este puede variar entre 0.5 y 30kV y tamaño de haz de prueba de 10 mm. La Figura 3-12 muestra el equipo de microscopía electrónica de barrido donde se desarrollaron las pruebas.



**Figura 3-12 Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6060LV**

### **3-3.2 Difracción de Rayos - X**

Los Rayos - X son radiaciones electromagnéticas de elevada energía y longitud de onda pequeña que oscila entre 0.02 y 100 Å, los cuales se manifiestan como energía radiante, emitidos por los átomos debido a profundas perturbaciones en sus estructuras electrónicas. Cuando un haz de Rayos - X incide en la superficie de un material sólido a cualquier ángulo, una porción de este haz es dispersada en todas las direcciones debido a los electrones asociados a los átomos o iones que se encuentran en el trayecto, pero el resto del haz puede dar lugar al fenómeno de difracción de Rayos - X, el cual tiene lugar si existe una disposición ordenada de átomos. Los haces difractados tienen un cambio de fase de las ondas las cuales pueden producir una interferencia constructiva o destructiva como se muestra en la Figura 3-13.



**Figura 3-13** Desviación producida por la difracción, el cambio de fase de las ondas produce interferencia constructiva (izquierda) o destructiva (derecha)

W.L Bragg relacionó la longitud de onda de los Rayos - X y la distancia interatómica con el ángulo de incidencia del haz difractado, si no se cumple la relación de Bragg, la interferencia es de naturaleza no constructiva y el campo del haz difractado es de baja intensidad. La interferencia es constructiva cuando la diferencia de fase entre la radiación emitida por diferentes átomos es proporcional a  $2\pi$ , esta condición es la que expreso Bragg y se conoce como la ley de Bragg. Descrita por la ecuación 3.11.

$$n\lambda = 2d\text{Sen}\theta \quad \text{(Ec. 3.11)}$$

Donde:

$n$ : Es un número entero.

$\lambda$ : Longitud de onda de los Rayos - X.

$d$ : Distancia entre los átomos de la red cristalina.

$\theta$ : Ángulo entre rayos incidentes y el plano de dispersión.

Todas las sustancias cristalinas dispersan Rayos-X, con un patrón de difracción produciendo una huella en su estructura atómica y molecular. De ahí que la difracción de Rayos-X presenta una característica única con la



cual los componentes se identifican como compuestos específicos a partir de sus diagramas de difracción (Wormald, 1979).

La difracción de Rayos-X es una técnica que permite dilucidar las estructuras cristalinas presentes en el material y es altamente confiable debido a su precisión.

#### *Preparación de las muestras*

Debido a la anisotropía presentada en el bambú igual a la de la madera (Diccionario forestal 2005), es necesario llevar a cabo los análisis de difracción en las dos direcciones previamente descritas en las secciones anteriores.

Esta técnica permite determinar si existen orientaciones cristalográficas preferenciales en los componentes cristalinos de la *Guadua*. Debido a que los análisis de Rayos - X son no destructivos, las muestras utilizadas en este análisis, son las mismas utilizadas en la microscopía de barrido electrónico y la preparación es la antes mencionada. Las muestras son pulidas en las direcciones a analizar y colocadas en el portamuestras del difractómetro.

#### *Desarrollo de la prueba*

Los análisis de difracción de Rayos -X se llevaron a cabo en el Instituto de Investigación de Materiales (IIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en ciudad de México, con un difractómetro Siemens D500 operando a 35 K y 15 mA con una radiación Cu K $\alpha$  de  $\lambda=1.406 \text{ \AA}$  con un barrido desde 4 a 70° en escala 2 $\theta$  y un tamaño de paso de 0.05 s. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La identificación de los elementos cristalinos estuvo basada en los patrones 00-003-0289 para la celulosa (Imberty, *et al.*, 1988) y el 00-043-1858 para la amilosa (Andrés, 1928).

### 3-3.3 Propiedades Mecánicas

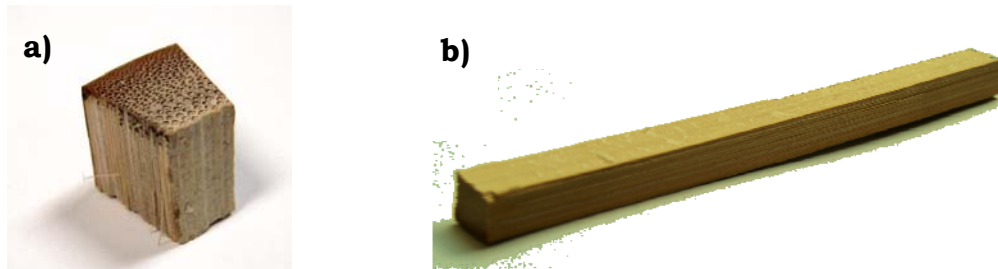
Existen diferentes propiedades que pueden ser medidas en materiales para la construcción. En el caso específico de la *Guadua* donde sus culmos usados como material estructural en las construcciones es necesario conocer la resistencia a la compresión paralela al eje debido a las cargas que soporta cuando es utilizada como columna. Otros esfuerzos que se presentan comúnmente en estructuras son los esfuerzos de tensión y flexión. Para el desarrollo de este trabajo se realizó el estudio de la resistencia a la compresión paralela a la fibra y la resistencia a la flexión. Los ensayos de tensión fueron omitidos debido a que las mordazas de las máquinas universales no pueden sujetar las probetas de *Guadua*.

#### *Preparación de las muestras*

Antes de someter las muestras a ensayos mecánicos es necesario prepararlas de acuerdo a las especificaciones internacionales que rigen estos ensayos. El desarrollo de las pruebas mecánicas en este trabajo se llevó a cabo con algunas modificaciones a la norma de la Sociedad Americana para la medición de materiales o conocido por sus siglas en inglés como ASTM (American Section of the International Association for Testing Materials) D143-94 (2007).

Para la prueba de compresión se cortan muestras con 1.2 cm de altura, 1 cm ancho y espesor igual al de cada culmo, como lo muestra la Figura 3-14a. Las probetas para el ensayo de flexión tienen las siguientes dimensiones 16 cm de alto, 1 cm de ancho y espesor igual al de cada culmo como lo muestra la Figura 3-14b. Los espesores de los culmos de bambú son diferentes de acuerdo a la variedad y edad. Los valores de los espesores utilizados en este trabajo se encuentran entre 0.5 cm. y 2 cm. Una parte importante en el desarrollo de las propiedades mecánicas, es la preparación de las probetas, debido a que se encuentra directamente relacionado con los resultados. Las probetas utilizadas para este análisis fueron pulidas con un sistema de dados metálicos paralelos garantizando la uniformidad de la

superficie para que la fuerza aplicada al material se distribuya uniformemente en la sección transversal.



**Figura 3-14 (a) Probetas prueba compresión (b). Probetas prueba flexión**

*Desarrollo de la prueba*

Ambas pruebas, flexión y compresión, se realizaron en el Departamento de Ingeniería Biológica y Agrícola de la Universidad Estatal de Louisiana (Biological & Agricultural Engineering Department, LSU) en una máquina universal INSTRON 4401, en un cuarto con temperatura controlada ( $26 \pm 2$  °C) y humedad de  $62 \pm 3$  %. Estos valores de humedad y temperatura están especificados en las normas para medición de propiedades mecánicas de madera y en algunas de las adaptaciones que se han hecho para el bambú (ASTM D143 – 94 (2007); ICBO 2000), lo que permite una comparación directa de resultados. Las pruebas se realizaron por triplicado obteniéndose un promedio de los resultados. Las especificaciones de uso de la máquina están descritos en la norma ASTM D143-94 (2007).

La Figura 3-15 muestra la máquina universal donde fueron llevadas a cabo los ensayos de compresión.



**Figura 3-15 Máquina universal INSTRON 4401**

*Módulo de compresión*

De acuerdo a los métodos y normas utilizadas se puede calcular la fuerza máxima de compresión mediante la ecuación 3.9.

$$\sigma_{\max} = \frac{F_{\max}}{A} \quad \text{(Ec. 3.9)}$$

Donde:

$\sigma_{\max}$  = Fuerza máxima de compresión.

$F_{\max}$  = Carga máxima.

$A$  = Área de la sección transversal.

*Módulo de flexión*

La separación entre los dos puntos de apoyo de las probetas en la prueba de flexión es de 127mm.; la sonda se aplica perpendicular a la fibra y tiene una capacidad de 5000N. Los ensayos de flexión fueron desarrollados en triplicado.

Al aplicar carga de flexión en el material se produce un esfuerzo de tensión en el punto opuesto al punto de aplicación de la carga de la fuerza

central, la fractura comienza en este punto. De los ensayos de flexión es posible establecer el módulo de ruptura (MOR) que establece la resistencia del material. El módulo de ruptura se puede calcular por medio de la siguiente ecuación 3.10.

$$MOR = \frac{3PL}{2bh^2} \quad (\text{Ec. 3.10})$$

Donde:

P = Carga de Ruptura.

L= Distancia entre soportes.

b= Ancho de la muestra en el punto de ruptura.

h= Espesor de la muestra en el punto de rotura.

### 3-4 Correlación de resultados

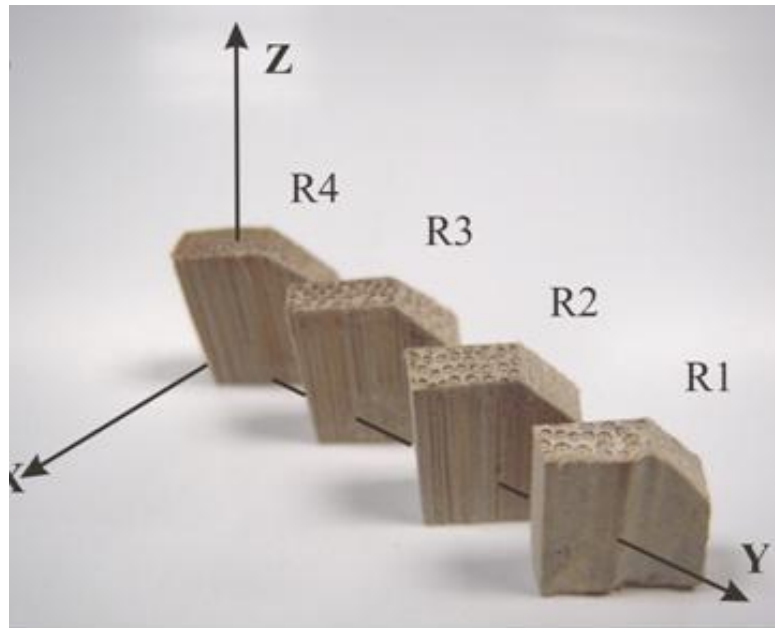
En la mayoría de materiales, las propiedades químicas, la morfología, la estructura y micro-estructura tienen alguna relación con el comportamiento mecánico de estos (Meyers, *et al.*, 2008; Krevelen y Nijenhuis 2009).

Conociendo los análisis químicos, identificando la composición de la *Guadua* y obteniendo su comportamiento en las pruebas mecánicas es posible realizar correlaciones entre ellos. La correlación entre dos variables refleja el grado en que se encuentran asociadas. Para la correlación de variables cuantitativas es posible utilizar un método estadístico conocido como correlación de *Pearson* que involucra las covarianzas y desviaciones estándar de los datos obtenidos. El coeficiente de *Pearson* fluctúa entre -1 y +1, una correlación de +1 indica que existe una correlación lineal directa perfecta entre las variables relacionadas y un valor de -1 indica que existe una relación lineal inversa perfecta entre las variables; cuando el coeficiente de *Pearson* se acerca a cero (0) se interpreta como la no existencia de correlación lineales de las variables (Salkind y Escalona 1997).

### **3-5 Distribución de fibra y morfología a través del culmo**

Dentro de diferentes estudios que se han realizado a bambúes asiáticos y americanos se ha podido establecer que la distribución de la fibra y su morfología varía a través del culmo (Ray, *et al.*, 2005). Algunos autores han tratado de correlacionar la distribución de las fibras con las propiedades mecánicas (Ray, *et al.*, 2005; Obataya, *et al.*, 2007). Por otra parte, el conocimiento y análisis de fibras naturales ha despertado el interés de varios investigadores (Valdez, *et al.*, 1999; Haijun y Sain, 2003; Dieter, *et al.*, 2004). Debido a la importancia de la fibra, se ha desarrollado un análisis enfocado a la determinación de la variación y la distribución de la fibra dentro del culmo. En este último análisis solo las variedades Macana y Rayada Amarilla fueron utilizadas, debido a la abundancia de esta variedad en la región.

Los análisis desarrollados para determinar esta variación y distribución fueron: Contenido de fibra a través del culmo, SEM para observar la morfología de las fibras y su variación morfológica con respecto al espesor del culmo y XRD para determinar la estructura cristalina de la fibra y sus cambios a través del culmo. Las probetas analizadas son secciones de culmo de GAK en su variedad Rayada Amarilla y Macana. Los culmos de estas variedades fueron cortados en cuatro secciones iguales nombradas R1, R2, R3 y R4; siendo R1 la parte interna de la planta y R4 la parte más externa del culmo como se muestra en la Figura 3-16.



**Figura 3-16 Secciones del culmo de *Guadua Angustifolia* Kunth R1 parte interna  
R4 parte externa**

---

# Capítulo 4

## 4 RESULTADOS Y DISCUSION

---

Este capítulo recopila los resultados experimentales obtenidos mediante los diferentes ensayos realizados a la GAK. En primer lugar se discutieron los análisis químicos, posteriormente los análisis físicos y por último se hizo una correlación entre ambos.

### 4.1 Descripción de las muestras

Las especificaciones de obtención de las muestras así como sus tratamientos previos a los análisis fueron descritos en el capítulo 3 sección 3.1. En esta sección no se tiene ningún resultado, debido a que no se lleva a cabo ninguna medición.

### 4.2 Caracterización Química

#### 4.2.1 Determinación de extractivos

La Tabla 4.1 muestra el porcentaje de extractivos en etanol determinados gravimétricamente y los extractivos en agua obtenidos por HPLC para cada una de las cuatro variedades de *Guadua* en culmos maduros y jóvenes.



**Tabla 4.1 Porcentaje de Extractivos en alcohol y porcentajes de sacarosa en cada uno de los cuatro espécimen analizados y su variación.**

Variedad	% <i>EXTRACTIVOS ETANOL</i>		% <i>EXTRACTOS AGUA</i>	
	Joven	Madura	Joven	Madura
<b>Macana</b>	1.92 ± 0.03 <sup>c</sup>	2.33 ± 0.07 <sup>c</sup>	2.02 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.46 ± 0.02 <sup>c</sup>
<b>Cebolla</b>	1.66 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.75 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.02 ± 0.01 <sup>d</sup>
<b>Rayada Amarilla</b>	2.17 ± 0.06 <sup>d</sup>	3.08 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.24 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>Castilla</b>	1.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.01 <sup>d</sup>	2.59 ± 0.03 <sup>b</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre si  $p < 0.05$

Se puede observar a partir de los resultados mostrados en la tabla, que el porcentaje de extractivos aumentan con la edad. Estos resultados coinciden con los reportados por Li (2004). El contenido de extractivos en las cuatro variedades de Guadua, tanto en culmos jóvenes como maduros son estadísticamente diferentes. Li (2004) encontró que la edad tiene un efecto importante en el contenido de extractivos, aumentando en el primer ciclo de vida y decreciendo gradualmente en bambúes sobremaduros.

#### 4.2.2 Determinación de Carbohidratos estructurales y lignina

El contenido de total de lignina es igual a la suma de la lignina soluble e insoluble. La Tabla 4.2 muestra los valores del contenido de lignina en las cuatro variedades de GAK para culmos jóvenes y maduros.

**Tabla 4.2 Contenido de lignina en las cuatro variedades de Guadua *Angustifolia* Kunth en culmos jóvenes y maduros**

Variedad	Joven	Madura
<b>Macana</b>	23.06 ± 1.2 <sup>d</sup>	18.09 ± 0.6 <sup>a,b</sup>
<b>Cebolla</b>	27.75 ± 1.3 <sup>a</sup>	14.34 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>Rayada Amarilla</b>	24.33 ± 0.7 <sup>c</sup>	16.40 ± 0.9 <sup>a,b</sup>
<b>Castilla</b>	26.33 ± 1.4 <sup>b</sup>	18.70 ± 0.7 <sup>b</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre si  $p < 0.05$

El contenido de lignina disminuye con la edad del bambú. En estudios realizados por Li (2004) en el bambú *Phyllostachys pubescens* en tres diferentes edades no reportan una variación significativa en el contenido de lignina. Por otro lado, Lybeer y Koch (2005) al estudiar la lignificación del bambú *Phyllostachys viridiglaucescens* en su proceso de envejecimiento entre 1 mes y más de 12 meses de edad, encontraron que la lignina se deposita tempranamente en el desarrollo de la célula y no presenta ninguna variación con la edad en este lapso estudiado.

Como bien se sabe los materiales lignocelulosicos tienen diferentes aplicaciones donde se involucran procesos, generalmente químicos o enzimáticos, para deglificarlos. Al encontrar que el contenido de lignina en los culmos de *GAK* decrece con la edad, en las cuatro variedades y en algunas de ellas de forma significativa con decrementos de más del 10 %, podríamos tener un proceso natural de degradación de lignina. Este proceso puede ser potencialmente aplicado en procesos biotecnológicos como la producción de etanol, material combustible a partir de celulosa y mejoramiento de alimentos para animales (Segura, *et al.*, 2006). El contenido de carbohidratos estructurales, celulosa y hemicelulosa, se resume en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3 Contenido de hemicelulosa y celulosa en las cuatro variedades de *Guadua angustifolia* Kunth en culmos jóvenes y maduros**

Variedad	% Hemicelulosa		% Celulosa	
	Joven	Maduro	Joven	Maduro
<b>Macana</b>	18.97 ± 1.05 <sup>a</sup>	19.88 ± 0.97 <sup>a</sup>	45.80 ± 1.68 <sup>c</sup>	44.54 ± 1.15 <sup>b</sup>
<b>Cebolla</b>	17.79 ± 0.94 <sup>b</sup>	14.51 ± 0.52 <sup>b</sup>	49.10 ± 1.55 <sup>b</sup>	36.41 ± 1.32 <sup>d</sup>
<b>Rayada Amarilla</b>	16.02 ± 1.04 <sup>c</sup>	14.46 ± 0.23 <sup>b</sup>	51.59 ± 1.72 <sup>a</sup>	41.36 ± 1.05 <sup>c</sup>
<b>Castilla</b>	18.05 ± 0.62 <sup>b</sup>	15.58 ± 1.07 <sup>b</sup>	48.69 ± 1.26 <sup>b</sup>	43.69 ± 1.42 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre sí  $p < 0.05$

De acuerdo a los resultados, es posible observar que la composición química de la *GAK* es principalmente celulosa, lo cual concuerda con lo

reportado para otras especies de Bambú (Scurlock, 2000; Higuchi, 1955). Por otro lado, es posible también observar que el contenido de celulosa y hemicelulosa tiene diferencias estadísticamente significativas entre cada una de las variedades.

El contenido de hemicelulosa encontrado para la GAK no difiere del reportado por Maekawa (1976), quien señaló valores de hemicelulosa entre el 17.9 % y el 20 % para un bambú asiático verde (*Phyllostachys reticulata*). El contenido de celulosa reportado por Higuchi (1957) para 3 diferentes clases de bambú varió entre un 25 % y 49 %, este es menor comparado con la GAK, donde se obtuvo un mínimo de 36 % y un máximo de 51 %. Las tres especies de bambú utilizadas por Higuchi (1957) son de la clase *Phyllostachys*, ampliamente estudiada y aplicada en la industria. Los resultados obtenidos en este trabajo sitúan a la GAK como una materia prima para la industria del papel y los refuerzos de manufactura.

#### **4.2.3 Contenido de Cenizas**

La composición de cenizas de bambú esta dada por minerales inorgánicos principalmente silicio, calcio y potasio y en menor cantidad por manganeso y magnesio. El principal componente inorgánico del bambú es la sílice distribuida de manera diferente a lo largo del culmo del bambú. El contenido de cenizas presente en los especímenes analizados se encuentra reportado en la Tabla 4.4. De acuerdo con el análisis estadístico se puede observar que se encontraron diferencias significativas entre las variedades de Guadua analizadas.

Resulta interesante señalar que el contenido de Cenizas de la GAK decrece con el tiempo. Este resultado se contrapone con lo reportado por Yusoff *et al* (1992), quienes encontraron que el contenido de cenizas incrementa con la edad del bambú.

**Tabla 4.4 Porcentaje de Cenizas presentes en culmos jóvenes y maduros de *Guadua angustifolia* Kunth**

<i>Variedad</i>	<i>Joven</i>	<i>Maduro</i>
<b>Macana</b>	2.68 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.02 <sup>c</sup>
<b>Cebolla</b>	2.56 ± 0.4 <sup>c</sup>	2.30 ± 0.6 <sup>a</sup>
<b>Rayada Amarilla</b>	1.86 ± 0.3 <sup>d</sup>	1.43 ± 0.4 <sup>b</sup>
<b>Castilla</b>	2.93 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>d</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre si  $p < 0.05$

El contenido de ceniza en la planta puede representar un factor importante para la utilización de esta en algunos procesos industriales. Esto es debido a que un alto contenido de cenizas afecta la maquinaria en los procesos produciendo mayor desgaste (Tomalang, *et al.*, 1980). Los culmos de *GAK* maduros tienen una ventaja ante los jóvenes y los bambúes asiáticos estudiados por otros autores.

La composición química completa de la *GAK* difiere con respecto a los bambúes asiáticos analizados por Scurlock (2000) en el contenido de manosa. Para la *GAK* no se reporta contenido de manosa, mientras que en los analizados por Scurlock (2000) se tiene un contenido mínimo de esta. Otra diferencia notable entre los análisis de *GAK* y los realizados por Scurlock (2000) es que la lignina en los bambúes asiáticos no decrece con la edad.

#### 4.2.4 Contenido de fibra

En la Tabla 4.5 se muestra el contenido de fibra soluble e insoluble en la GAK.

**Tabla 4.5 Contenido de fibra soluble e insoluble en las cuatro variedades de *Guadua angustifolia* Kunth analizadas**

Variedad	INSOLUBLE (%)		SOLUBLE (%)	
	Joven	Maduro	Joven	Maduro
<b>Macana</b>	74.41 ± 1.34 <sup>c</sup>	84.94 ± 1.35 <sup>b</sup>	10.36 ± 0.76 <sup>a</sup>	9.7 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>Cebolla</b>	87.43 ± 1.23 <sup>b</sup>	86.77 ± 2.03 <sup>a,b</sup>	3.6 ± 0.24 <sup>b</sup>	10.36 ± 0.98 <sup>a</sup>
<b>Rayada</b>	83.22 ± 2.5 <sup>b</sup>	79.33 ± 2.1 <sup>c</sup>	2.16 ± 0.3 <sup>c</sup>	9.76 ± 0.67 <sup>a</sup>
<b>Amarilla</b>				
<b>Castilla</b>	92.45 ± 1.4 <sup>a</sup>	87.39 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	9.22 ± 0.8 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre si  $p < 0.05$

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla anterior, se observa que las cuatro variedades de GAK tienen como componente principal fibra insoluble, la cual contiene celulosa, algunas hemicelulosas y lignina. Para la variedad macana tenemos una variación significativa ( $\approx 10\%$ ) de la fibra insoluble con la edad, mientras que las otras variedades no son tan significativas. Por otra parte, la fibra soluble varía significativamente en todas las variedades excluyendo a la Macana.

Se puede observar también que solo en la variedad Macana el contenido de fibra insoluble aumenta mientras que el contenido de fibra soluble disminuye con la edad. Esto se debe a que esta variedad en sus primeras etapas de crecimiento tiene un culmo débil y angosto, a medida que el culmo crece, su espesor aumenta significativamente, lo que no sucede con las otras variedades, donde el espesor se mantiene casi fijo en su etapa de desarrollo. La Tabla 4.6 muestra en resumen el análisis composicional de las cuatro variedades de *Guadua Angustifolia* Kunth en culmos jóvenes y maduros.

Tabla 4.6 Análisis composicional de *Guadua Angustifolia* Kunth

	<b>EDAD</b>	<b>CENIZAS (%)</b>	<b>EXTRACTIVOS ETANOL (%)</b>	<b>LIGNINA (%)</b>	<b>GLUCOSA (%)</b>	<b>XILOSA (%)</b>	<b>ARABINOSA (%)</b>	<b>MANOSA (%)</b>
<b>Macana</b>	Joven	2.68	1.92	23.06	47.8	15.85	2.18	ND
	Maduro	0.92	2.33	18.09	43.69	17.24	2.61	ND
<b>Cebolla</b>	Joven	2.56	1.66	27.75	49.17	15.64	2.15	ND
	Maduro	2.30	1.92	14.34	37.34	12.92	1.61	ND
<b>Rayada</b>	Joven	1.86	2.17	24.33	52.49	14.14	1.91	ND
	Maduro	1.43	3.08	16.40	41.54	12.75	1.74	ND
<b>Castilla</b>	Joven	2.93	1.42	26.33	50.26	15.85	2.22	ND
	Maduro	0.44	2.46	18.70	44.54	13.69	1.89	ND
<b>NIST Vagase</b>		3.62	3.90	19.06	37.08	20.73	2.8	ND
		3.33	2.29	25	41.16	22.58	2.75	ND

ND: No detectado

#### 4.2.5 Contenido de Humedad

La Tabla 4.7 muestra el contenido de sólidos totales para cada una de las variedades de *GAK* en los culmos maduros y jóvenes.

**Tabla 4.7 Contenido de sólidos totales para Guaduas Jóvenes y maduras de las variedades estudiadas**

Variedad	Joven	Madura
<b>Macana</b>	92.40 ± 0.8 <sup>b</sup>	92.06 ± 0.7 <sup>b</sup>
<b>Cebolla</b>	93.48 ± 0.9 <sup>b</sup>	91.43 ± 0.4 <sup>c</sup>
<b>Rayada Amarilla</b>	92.77 ± 0.5 <sup>a</sup>	92.31 ± 1.2 <sup>b</sup>
<b>Castilla</b>	93.11 ± 0.7 <sup>a</sup>	93.33 ± 0.6 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre si  $p < 0.05$

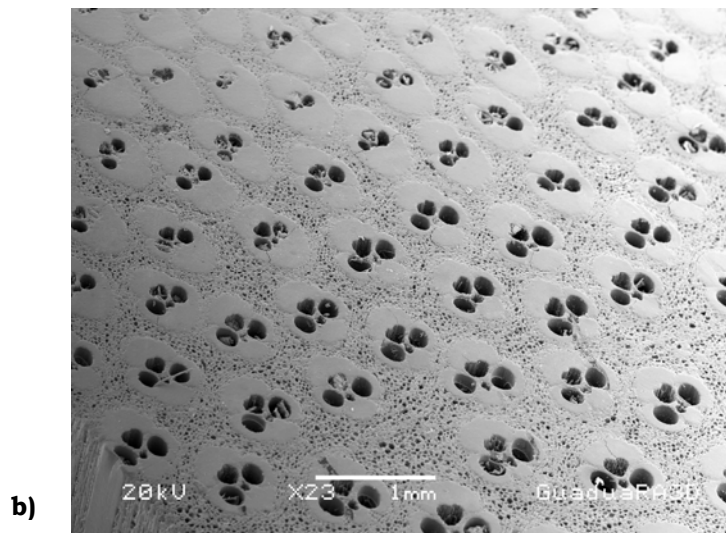
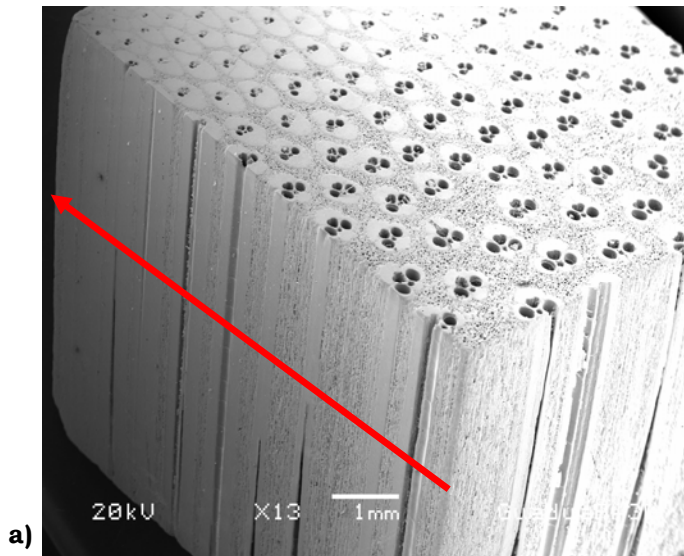
De acuerdo a la Tabla 4.7 es posible observar que la *GAK* presenta un alto contenido de sólidos. De acuerdo al análisis estadístico ANOVA se observa que las variedades jóvenes Macana y Cebolla no presentan diferencias significativas e igualmente pasa con la Rayada Amarilla y la Castilla; en los culmos maduros, se tiene que solo dos variedades no presentan diferencias significativas y son la Rayada amarilla y la Macana mientras que la Cebolla y la Castilla son diferentes en comparación con los demás culmos. En general, la humedad de todos los culmos de *GAK* se encuentra por debajo del 10%, esto facilita su almacenamiento impidiendo la proliferación de hongos.

### 4.3 Caracterización Física

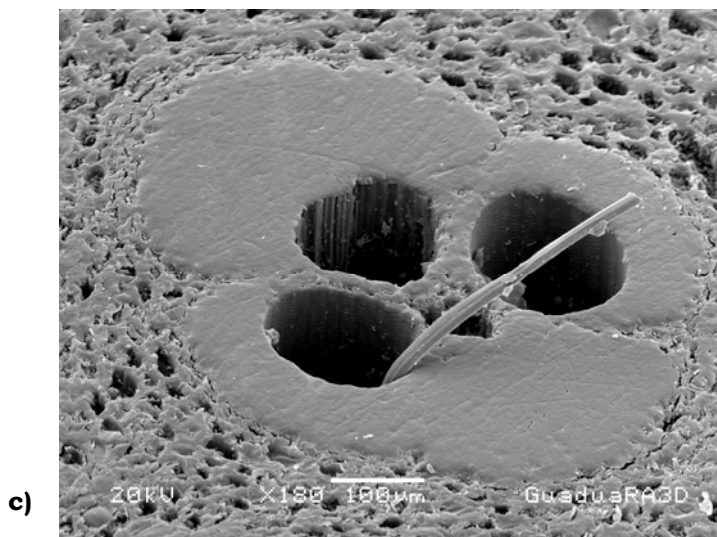
La caracterización física comprende dos secciones, la primera corresponde a la determinación de la microestructura de la *GAK* mediante las técnicas de SEM y XRD, la segunda comprende la determinación de la respuesta mecánica en flexión y compresión de la *GAK* por medio de una máquina universal.

### 4.3.1 Microscopía electrónica de barrido SEM

El estudio se llevó a cabo en las direcciones axial y radial con el propósito de obtener un análisis completo de su morfología. La Figura 4-1 muestra una serie de micrografías en 3D a diferentes aumentos del culmo de GAK Rayada Amarilla. Estas micrografías permiten tener una vista axial y tangencial del culmo.







**Figura 4-1** Micrografías de culmos de *Guadua angustifolia* Kunth a) Micrografía en 3D, b) Vista transversal del culmo de *Guadua angustifolia* Kunth, c) Acercamiento de la vista transversal de la *Guadua Angustifolia* Kunth donde se aprecia los haces vasculares rodeados del tejido que contiene la fibra.

En ambas direcciones se puede observar como el tejido que rodea a los haces vasculares (esclerenquitimoso) se hace cada vez más denso a medida que se aleja de la parte interna hacia la parte externa (como lo indica la flecha superpuesta en una de las micrografías) y como ya ha sido señalado por varios autores (Ghavami, 2003). Estas micrografías muestran también en detalle los haces vasculares de la *Guadua*, responsables del almacenamiento y distribución de agua y otros fluidos desde la raíz hacia toda la planta. El tejido parenquitimoso está formado por las células parénquimas, las cuales almacenan en su interior el almidón, fuente principal de energía de la planta (Liese, 2002).

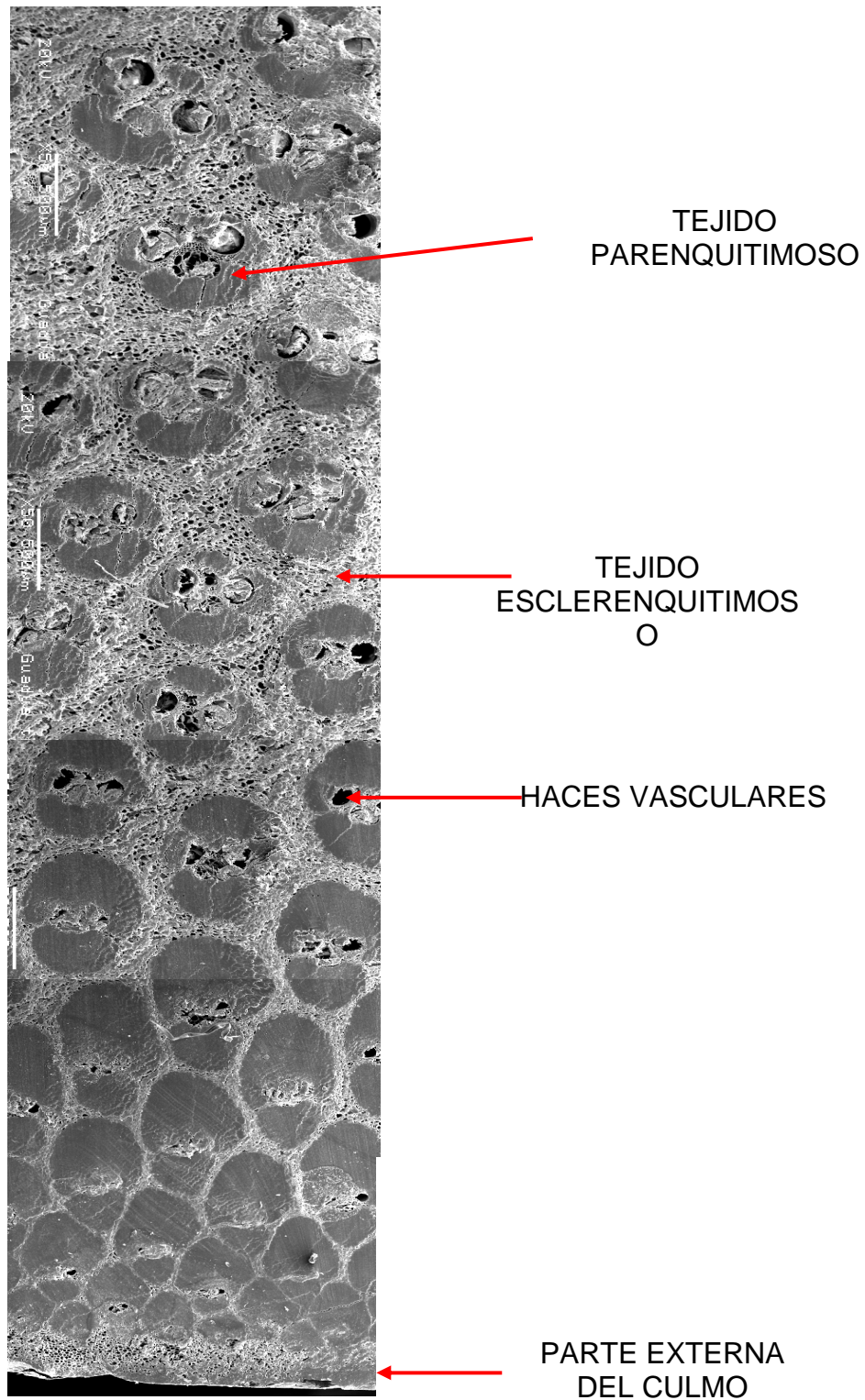
Las fibras que posee el bambú han sido tema de interés en varios campos en los últimos años. Los estudios realizados al bambú han demostrado, que el contenido de fibra se incrementa desde la parte interna hasta la parte externa del culmo. Otros trabajos han señalado que esta fibra está relacionada con la respuesta mecánica, razón por la cual el bambú se usa como refuerzo de matrices poliméricas (Tomalang, *et al.*, 1980; Deshpande, *et al.*, 2000; Demiroz, *et al.*, 2008).

La Figura 4-2 muestra en detalle la sección tangencial del culmo de *GAK* variedad Rayada Amarilla. La figura permite observar el tejido parénquimo, el cual en esta clase de *Guadua* se encuentra rodeando los haces vasculares y contienen las fibras de celulosa.

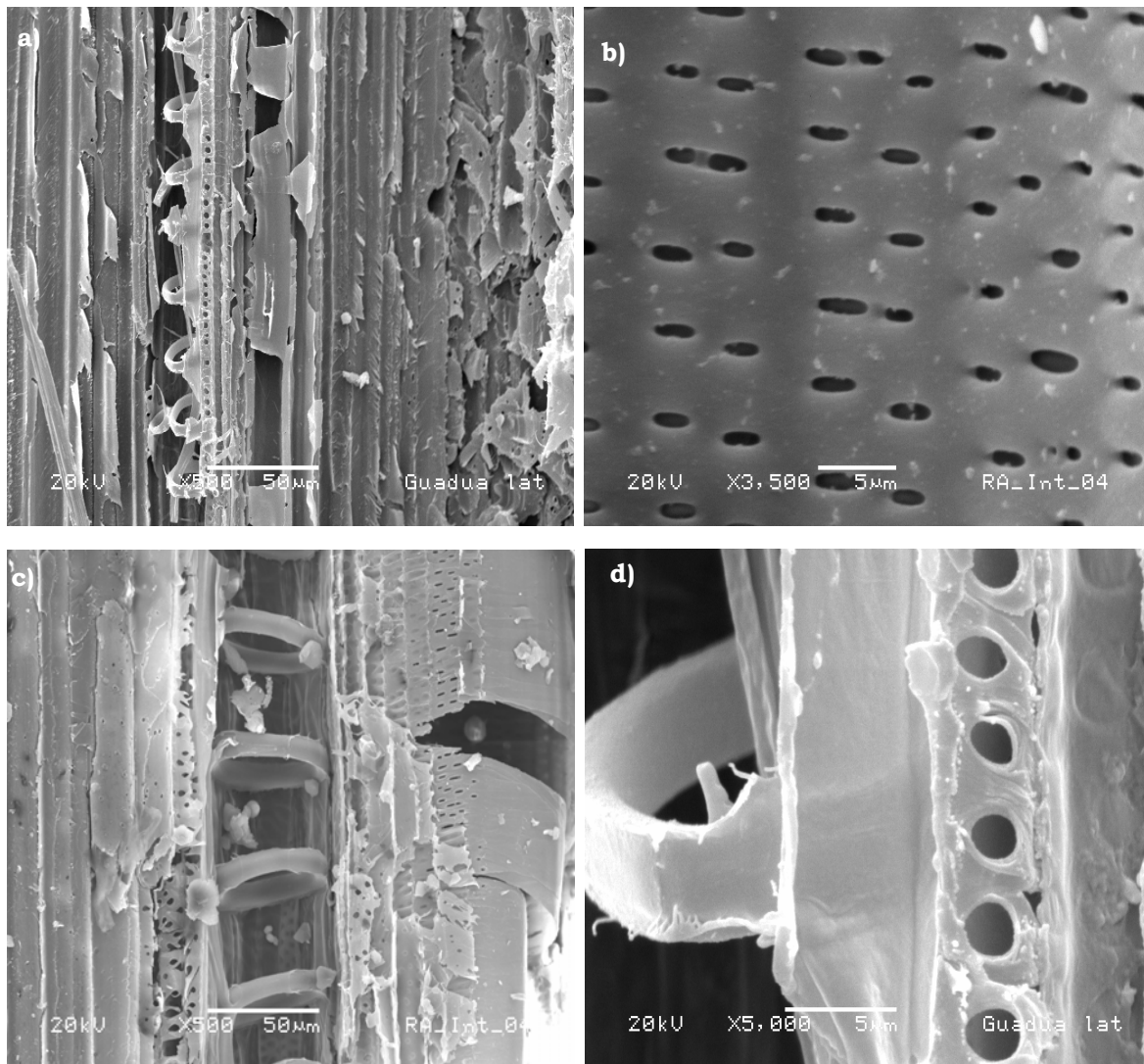
El tejido esclerénquimo, está compuesto por células parénquimas que almacenan los almidones y brindan la energía a la planta. La morfología observada para la parte tangencial de los culmos de *Guadua* es acorde con las reportadas por Montiel *et al.* (2006) para un culmo de *Guadua macclurei* Poaceae: Bambusoideae cultivada en Costa Rica.

En este mismo trabajo identifica diferentes estructuras anatómicas, como protoxilema con anillos individuales de soporte, filoras y tejidos parenquitimosos, los cuales fueron encontradas en la *GAK* y se pueden observar en la Figura 4-3.

Estas estructuras se presentan en las cuatro variedades de *GAK*. De acuerdo a este resultado se puede concluir que la morfología de las estructuras anatómicas de la *GAK* no se encuentra relacionada con la edad, el suelo ni la especie del espécimen analizado.



**Figura 4-2** Micrografías secuenciales de las sección transversal del culmo de *Guadua angustifolia* Kunth variedad Rayada Amarilla culmo joven.



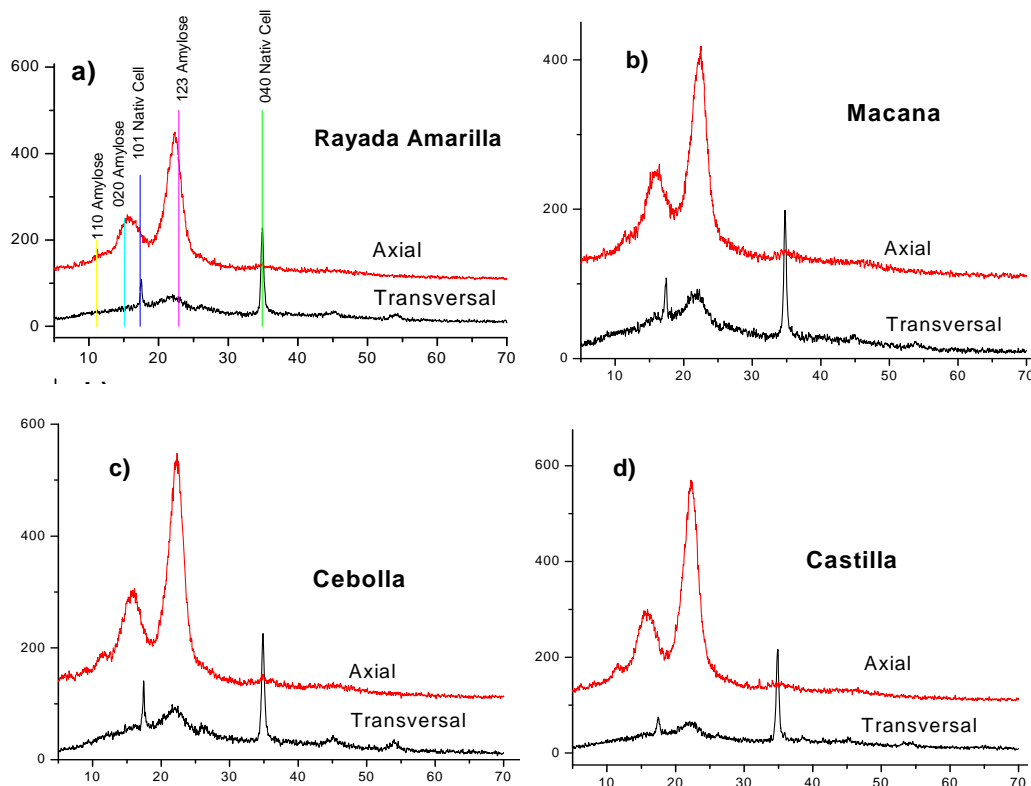
**Figura 4-3 Estructuras anatómicas presentes en la *Guadua angustifolia* Kunth todas pertenecientes a cortes longitudinales. a), b) y d) Protoxilema con anillos de soporte a diferentes magnificaciones, c) Tejido parénquima.**

#### 4.3.2 Difracción de Rayos - X

Los análisis de difracción de Rayos - X se realizaron en dos direcciones en cada una de las cuatro variedades de GAK.

La Figura 4-4 muestra los difractogramas de cada una de las variedades de GAK en la dirección axial y la dirección transversal a) Rayada Amarilla, b) Macana, c) Cebolla y d) Castilla. La identificación de los picos presentes en el difractograma se realizó con los archivos de difracción de polvos o

conocido por sus siglas en inglés como PDF (Powder Diffraction File) de la alfa-amilosa PDF 00-043-1858, para la identificación de los almidones previamente observados por las micrografías de barrido electrónico y con el PDF 00-003-0289 para la celulosa nativa, polímero típico presente en las plantas y principal componente de los culmos de bambú. Como ya se mencionó en el capítulo anterior, el almidón está compuesto por dos moléculas amilosa y amilopectina, en la técnica de difracción de Rayos - X, solo es posible identificar la estructura de la amilosa debido a que la estructura de la amilopectina no ha sido reportada hasta el momento.



**Figura 4.4** Difractogramas de cuatro variedades de *Guadua angustifolia* Kunth en dirección axial y transversal.

Es posible observar en los difractogramas obtenidos que las guaduas presentan los mismos componentes químicos en ambas direcciones, sin embargo, su orientación cristalina se ve afectada por la dirección estudiada. Se puede inferir que los componentes químicos presentes en los culmos de

la GAK presentan una orientación preferencial de crecimiento. De otro lado, de esta figura podemos concluir que la celulosa tiene las orientaciones preferenciales 040 y 101 en la dirección transversal así como una cristalinidad mayor, que se asocia con el ancho de los picos, en esta misma dirección. Las diferentes orientaciones preferenciales también se encuentran asociadas a una de las propiedades principales de la madera: la anisotropía indica que todas las propiedades del material tienen características diferentes de acuerdo a la dirección que se analice.

Al encontrar que la celulosa tiene una orientación preferencial en la dirección transversal y una cristalinidad mayor en esta misma dirección, podemos concluir que el proceso de crecimiento de la Guadua, por ser un proceso rápido, obliga a las moléculas de la celulosa a ordenarse longitudinalmente creando estructuras ordenadas y cristalinas.

#### **4.3.3 Propiedades Mecánicas**

Las propiedades mecánicas que se determinaron en las muestras de GAK están dadas por la respuesta en compresión y la respuesta en flexión.

Debido a que no existe una norma técnica para la determinación de las propiedades mecánicas en el bambú, se utilizaron varios estándares para la determinación de estas (ASTM D143 – 94 (2007); INBAR). La mayoría de estándares creados para la determinación de propiedades mecánicas del bambú presentan limitantes para la realización de las pruebas, específicamente el tamaño de las probetas; debido a que utilizan probetas en las cuales intervienen secciones de culmos enteros. Por lo anterior los estándares que se utilizaron en este trabajo están adecuados a probetas pequeñas y fácilmente reproducibles.

##### **Compresión**

El área de la sección transversal varía entre las especies de GAK, debido a que los culmos no tienen los mismos espesores y cambian con la edad.

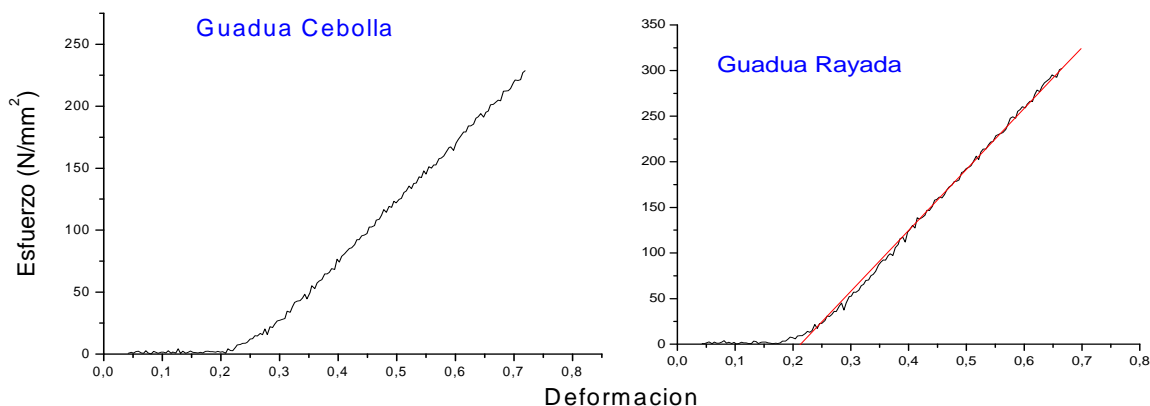
Las áreas de la sección transversal de los culmos están resumidas en la Tabla 4.8, el área de las probetas está directamente relacionada con la fuerza máxima de compresión y el módulo de elasticidad.

**Tabla 4.8 Áreas de las secciones transversales de culmos de *Guadua angustifolia* Kunth en especímenes jóvenes y maduros**

<i>Variedad</i>	<i>Joven (cm<sup>2</sup>)</i>	<i>Maduro (cm<sup>2</sup>)</i>
<b>Macana</b>	0.72	1.56
<b>Cebolla</b>	0.84	1.44
<b>Rayada Amarilla</b>	1.2	1.32
<b>Castilla</b>	1.56	1.8

La fuerza máxima a la compresión no se pudo determinar para estos especímenes, debido a que la máquina universal utilizada cuenta con una celda de 5,000N y la fuerza de compresión que soporta los culmos de GAK sobrepasa este valor. Los ensayos de compresión realizados a los especímenes demuestran que la *Guadua* tiene un comportamiento similar a los de los aceros y es por esta razón que diferentes autores la llaman como el acero vegetal.

La Figura 4-5 muestra la curva de esfuerzo contra deformación para dos de las variedades de *Guadua* analizadas en este trabajo: GAK variedad Cebolla y variedad Rayada Amarilla.



**Figura 4-5 Respuesta a la compresión de la *Guadua Angustifolia* Kunth Cebolla (izquierda) Rayada Amarilla (derecha)**

Es posible observar un comportamiento lineal en este material. Como es bien sabido, en una curva de esfuerzo *vs* deformación la parte lineal está asociada con el comportamiento elástico y da información acerca del módulo elástico, propiedad intrínseca que sirve para la clasificación de materiales.

Se realizaron tres ensayos de compresión a cada uno de los especímenes jóvenes y maduros para determinar el módulo de elasticidad en (N/mm<sup>2</sup>). El valor promedio para cada una de las muestras jóvenes y maduras se reporta en la Tabla 4.9. Una buena resistencia a la compresión hace que la GAK sea un candidato de materia prima para cimientos y soportes en construcción además su forma cilíndrica hace que su uso sea más apropiado en esta clase de trabajos, debido a que su uniformidad permite que se distribuyan mejor las cargas.

**Tabla 4.9 Módulos de elasticidad para *Guadua angustifolia* Kunth en culmos Jóvenes y maduros.**

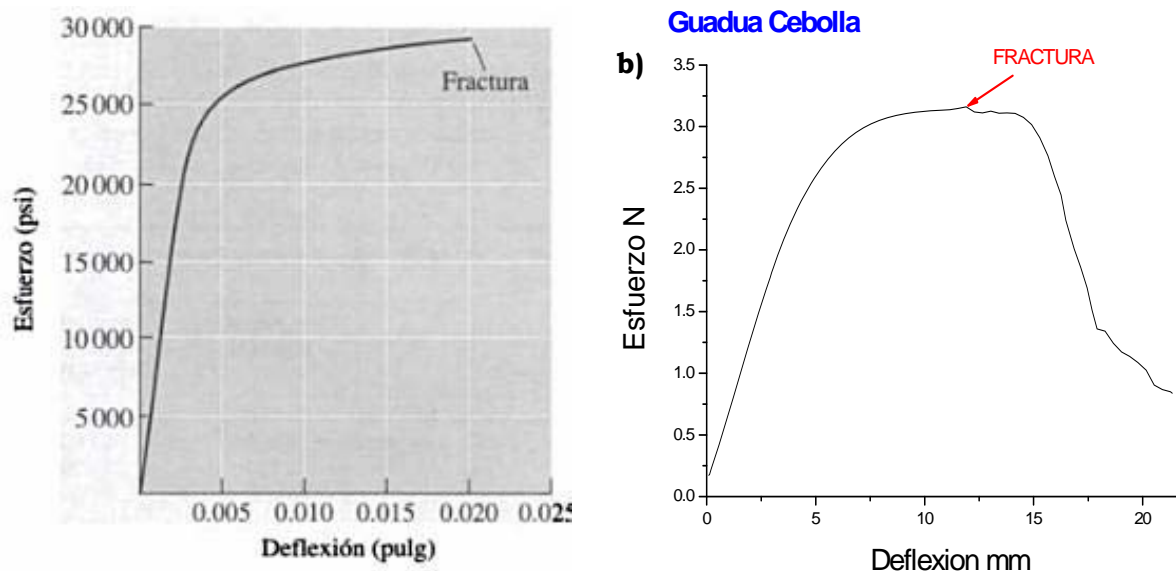
<i>Variedad</i>	Joven (N/mm <sup>2</sup> )	Maduro (N/mm <sup>2</sup> )
<b>Macana</b>	986.2 ± 8.5 <sup>a</sup>	357.65 ± 5.6 <sup>c</sup>
<b>Cebolla</b>	886.48 ± 7.3 <sup>b</sup>	482.38 ± 3.2 <sup>b</sup>
<b>Rayada Amarilla</b>	639.3 ± 6.4 <sup>c</sup>	645.80 ± 5.2 <sup>a</sup>
<b>Castilla</b>	305.50 ± 3.5 <sup>d</sup>	287.65 ± 1.5 <sup>d</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre si  $p < 0.05$

### ***Ensayos de Flexión***

La Figura 4-6a ilustra el diagrama típico para los ensayos de flexión en aceros (Askeland y Phule, 2004) y la Figura 4-6b ilustra el diagrama esfuerzo contra deflexión para GAK variedad Cebolla.





**Figura 4-6** Curva obtenida en ensayo de flexión. a) curva teórica para aceros. b) curva obtenida en los ensayos realizados en *Guadua angustifolia* Kunth variedad cebolla joven.

Se puede ver que la gráfica obtenida para las GAK es similar a la reportada en la literatura para el acero. Este comportamiento se puede asociar con la de un material con una ductilidad moderada, donde el cambio de pendiente se produce de una forma suave a diferencia de los materiales muy dúctiles que muestran un cambio de pendiente brusco o los materiales frágiles los cuales no muestran cambio en la pendiente (Askeland y Phulé, 2004).

Los valores promedios de los módulos de flexión se encuentran resumidos en la Tabla 4.10.

**Tabla 4.10** Módulo de ruptura (MOR) para diferentes culmos de GAK

<i>Variedad</i>	<i>Joven (N/mm<sup>2</sup>)</i>	<i>Maduro (N/mm<sup>2</sup>)</i>
<b>Macana</b>	96.87 ± 3.1 <sup>a</sup>	43.73 ± 2.1 <sup>c</sup>
<b>Cebolla</b>	127.39 ± 6.4 <sup>a</sup>	123.64 ± 6.2 <sup>a</sup>
<b>Rayada Amarilla</b>	104.65 ± 7.2 <sup>a</sup>	141.71 ± 5.3 <sup>a</sup>
<b>Castilla</b>	102.27 ± 5.1 <sup>a</sup>	80.37 ± 3.4 <sup>b</sup>

Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre si  $p < 0.05$

De acuerdo con el análisis estadístico, las variedades en su etapa joven no presentan diferencias significativas entre sí, pero en el proceso de maduración se denotan diferencias entre las especies de *Guadua* analizadas.

No existen muchos valores reportados del módulo de ruptura para bambúes. Cheng-Jung *et al.* (2006) reportaron algunos valores de MOR para el bambú asiático *Phyllosachys edulis*, los valores encontrados por estos autores son ligeramente mayores que los reportados para la GAK, pero los resultados no pueden tener una comparación directa debido a que en el trabajo de Cheng-Jung *et al.* (2006) no hay especificación sobre la edad del culmo utilizado ni de la parte del mismo.

En la mayoría de las variedades de GAK el módulo de ruptura disminuye con el paso de la edad. Esta disminución podría estar relacionada con la pérdida de algunos de sus componentes químicos como celulosa, hemicelulosa y lignina, principalmente, que también disminuyen con el paso del tiempo.

#### **4.4 Correlación de Resultados**

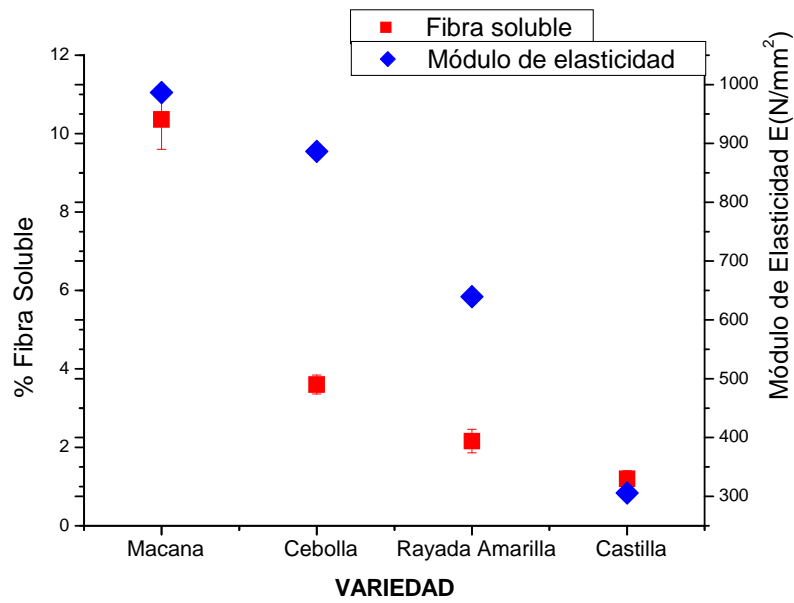
El objetivo central de este trabajo de investigación se basa en determinar una correlación entre algunas de las variables químicas y la respuesta mecánica de los especímenes. Conociendo que los componentes químicos mayoritarios de la *Guadua* son la celulosa, hemicelulosa y la lignina y estos componentes forman parte de la fibra, se realizó una correlación de estas variables con la respuesta mecánica por medio de métodos estadísticos. A través del análisis estadístico fue posible encontrar el coeficiente de correlación de *Pearson*. La Tabla 4.11 muestra los coeficientes de *Pearson* encontrados para las variables analizadas.

**Tabla 4.11 Coeficientes de correlaciones de Pearson entre las variables analizadas.**

		CULMOS JOVENES		CULMOS MADUROS	
		MOR	YOUNG	MOR	YOUNG
<b>Culmos Jóvenes</b>	Celulosa	0.7913	-0.3970		
	Hemicelulosa	-0.0661	0.4001		
	Lignina	0.4677	0.2428		
	Fibra soluble	0.1654	<b>0.7693</b>		
	Fibra Insoluble	0.3994	<b>-0.7281</b>		
<b>Culmos Maduros</b>	Celulosa			<b>-0.6269</b>	-0.5152
	Hemicelulosa			<b>-0.8427</b>	-0.5373
	Lignina			-0.2926	-0.2781
	Fibra soluble			0.2333	0.2542
	Fibra insoluble			-0.4365	<b>-0.8027</b>

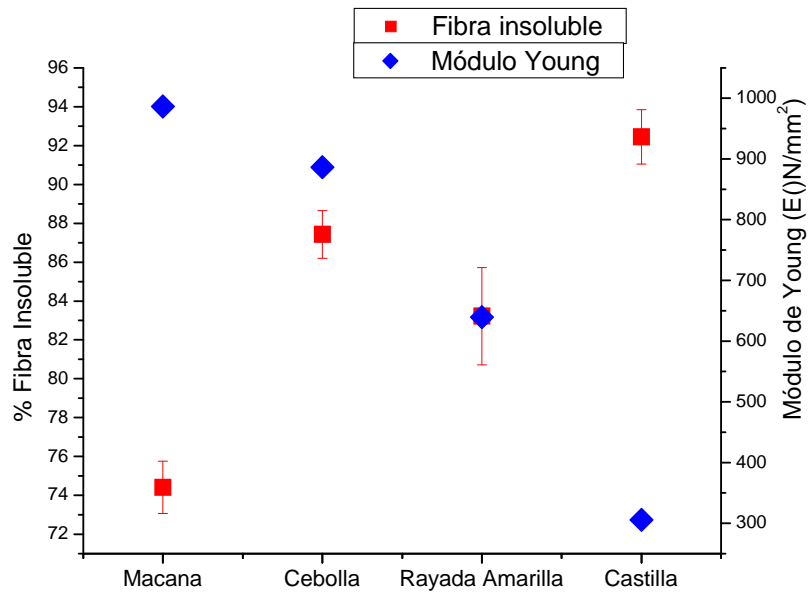
Los datos que se encuentran resaltados son aquellos en los que se encontró una correlación directa o indirecta entre las variables involucradas. La fibra soluble e insoluble juega un papel importante en la resistencia a la compresión de los culmos jóvenes mientras que para los culmos maduros solo se tiene una correlación con la fibra insoluble. Por otro lado, el módulo a la tensión solo se puede relacionar con el contenido de hemicelulosa y celulosa en culmos maduros, mientras que en los culmos jóvenes, de acuerdo al análisis estadístico no se puede tener ninguna correlación.

La Figura 4-7 muestra la variación del módulo de Young y el contenido de fibra soluble para cada variedad de Guadua analizada en los culmos jóvenes, se puede observar la relación directa que existe entre estas dos variables y corroborar los resultados encontrados por medio de los análisis estadísticos



**Figura 4 -7 Correlación entre % de Fibra soluble y módulo de elasticidad en culmos jóvenes de *Guadua angustifolia kunth*.**

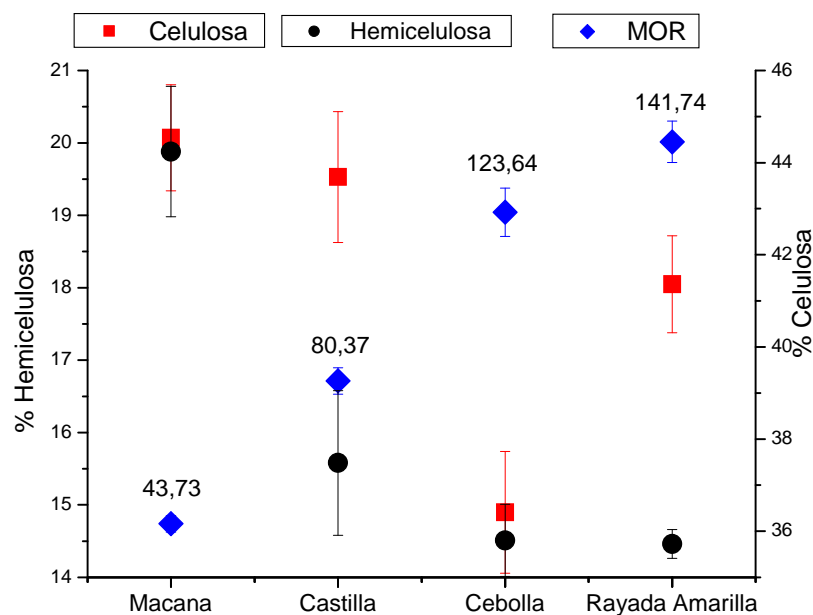
La Figura 4-8 muestra la relación entre el módulo de Young (E) y el porcentaje de fibra insoluble en los culmos jóvenes de *Guadua angustifolia Kunth*.



**Figura 4-8 Correlación entre % de fibra soluble y módulo de elasticidad en culmos jóvenes de *Guadua Angustifolia kunth***

De acuerdo a la gráfica se puede observar la relación indirecta entre estas variables. A medida que la fibra insoluble aumenta el módulo de elasticidad de las Guaduas esta disminuyendo. Esto indica que la fibra soluble no rige la resistencia a la compresión, en materiales compuestos como es el caso de la Guadua, la fibra soluble que es la matriz en donde se ubican estas fibras más rígidas influye en la respuesta mecánica y proporciona solidez a los culmos.

Por otra parte, de acuerdo al análisis estadístico previamente realizado se puede ver que en los culmos maduros existe una correlación entre la celulosa, hemicelulosa y lignina y el módulo de tensión MOR. La Figura 4-9 muestra la relación entre estas variables. Para la Guadua Macana y Cebolla se puede apreciar la relación indirecta que existe mientras la primera posee un alto contenido de celulosa y hemicelulosa es la que menor módulo de tensión presenta, todo lo contrario ocurre en la variedad cebolla en la cual se tiene el contenido más bajo de estos elementos químicos y presenta un alto módulo de tensión.



**Figura 4-9** Correlación entre % de hemicelulosa y módulo de tensión en culmos maduros de *Guadua angustifolia kunth*

De acuerdo a las gráficas es posible ver que ambos componentes químicos, celulosa y hemicelulosa juegan un papel importante en la respuesta a tensión de la GAK, es posible establecer que se tiene una relación indirecta entre estas variables químicas y la respuesta a la tensión. En la Figura 4-9 se observa que no solo la cantidad de fibra insoluble (Celulosa) es la responsable de las propiedades mecánicas de la *Guadua Angustifolia* Kunth, gran parte de este comportamiento se debe atribuir al contenido de fibra soluble que contenga el material.

Por tratarse de un material compuesto, la matriz y la fibra juegan un papel importante en la respuesta mecánica de este.

#### 4.5 Distribución y morfología de fibra a través del culmo

Determinación de fibra

La variación en el porcentaje de fibra insoluble a través del culmo de GAK están ilustrados en la Figura 4-10. En esta figura se puede observar la fibra insoluble presenta una tendencia al incremento desde la parte interna hacia la externa.

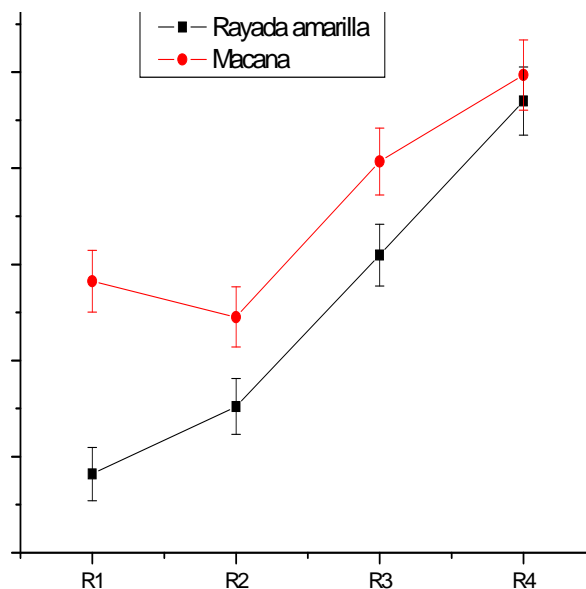


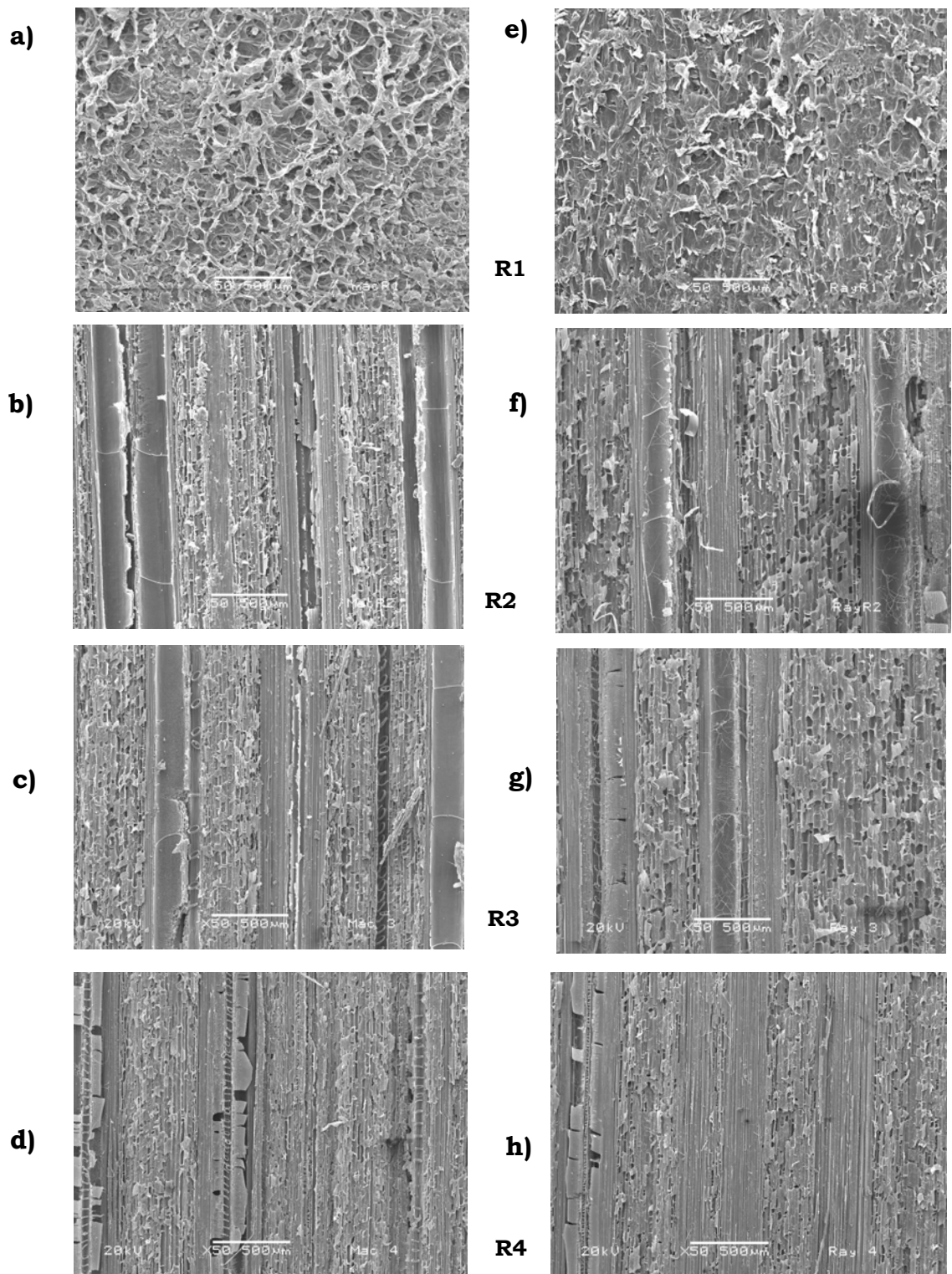
Figura 4-10 Variación en el porcentaje de Fibra insoluble a través del culmo de GAK

Es posible observar que la variedad Macana a diferencia de la Rayada Amarilla tiene un decremento en el contenido de fibra insoluble. Esta sería otra de las razones por la cual esta variedad de *Guadua* presenta un comportamiento diferente en la variación del contenido porcentual de la fibra con relación a la edad. Los resultados en el contenido de fibra en las cuatro secciones revelan un incremento en el contenido de fibra insoluble a través del espesor desde la parte interna hacia la externa; estos resultados se encuentran acordes con los reportados por Ghavami et al. 2003.

#### Microscopia de barrido electrónico

La Figura 4-11 muestra las imágenes de SEM obtenidas a 50X para las cuatro secciones internas del culmo de GAK en sus variedades Macana (micrografías a, b, c, d) y la variedad Rayada Amarilla (micrografías e, f, g, h).

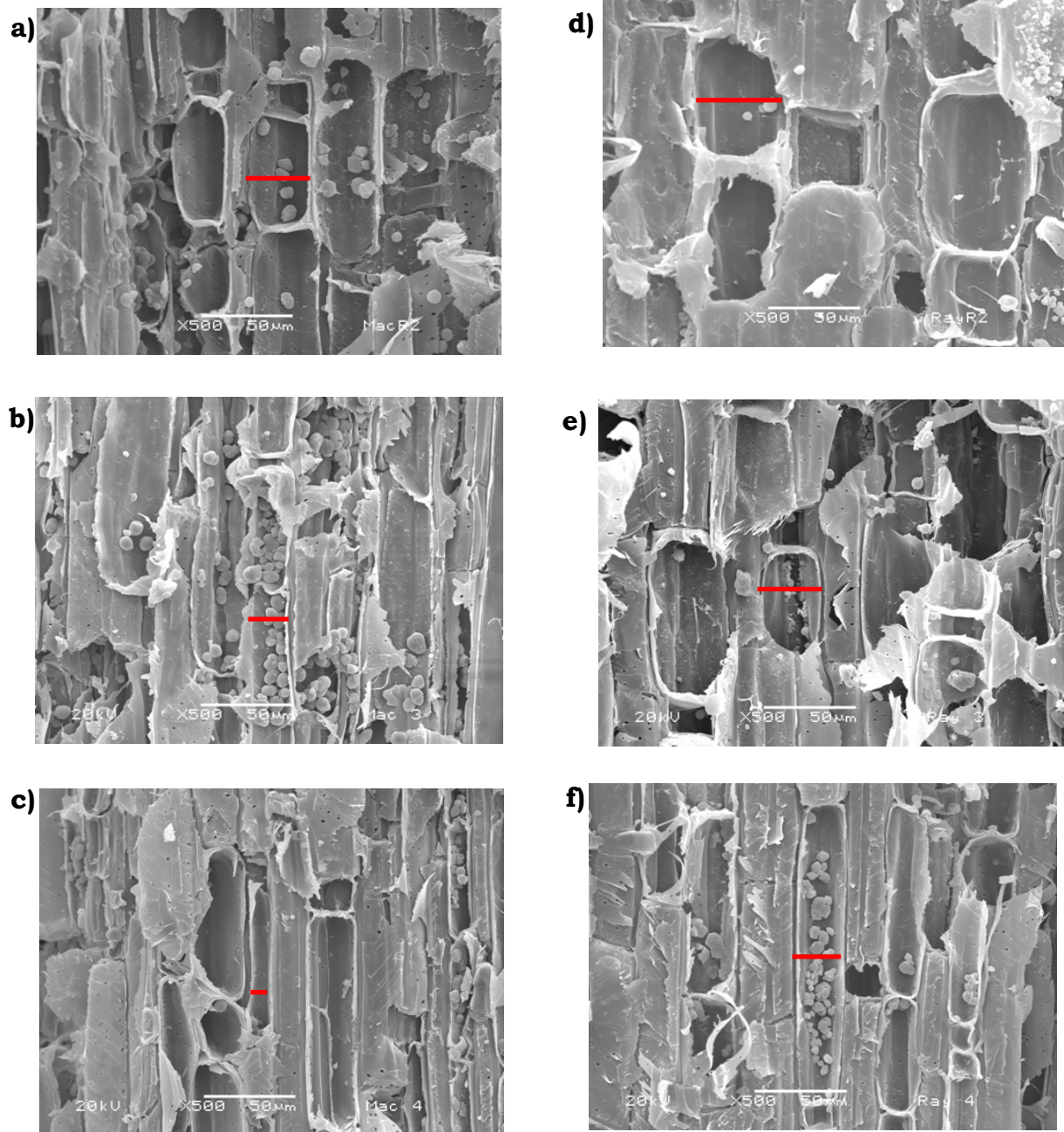
De las figuras se puede observar que la sección R1 (parte interna) presenta una morfología diferente a la del resto del culmo, correlacionando las micrografías con los datos encontrados de fibra es posible establecer que las estructuras presentes en la sección R1 para cada culmo no están compuestos por fibra orientadas como en el interior del culmo.



**Figura 4-11** Micrografías SEM 50X para R1, R2, R3 y R4 en GAK variedad macana (a,b,c,d) y variedad Rayada Amarilla (e,f,g,h)

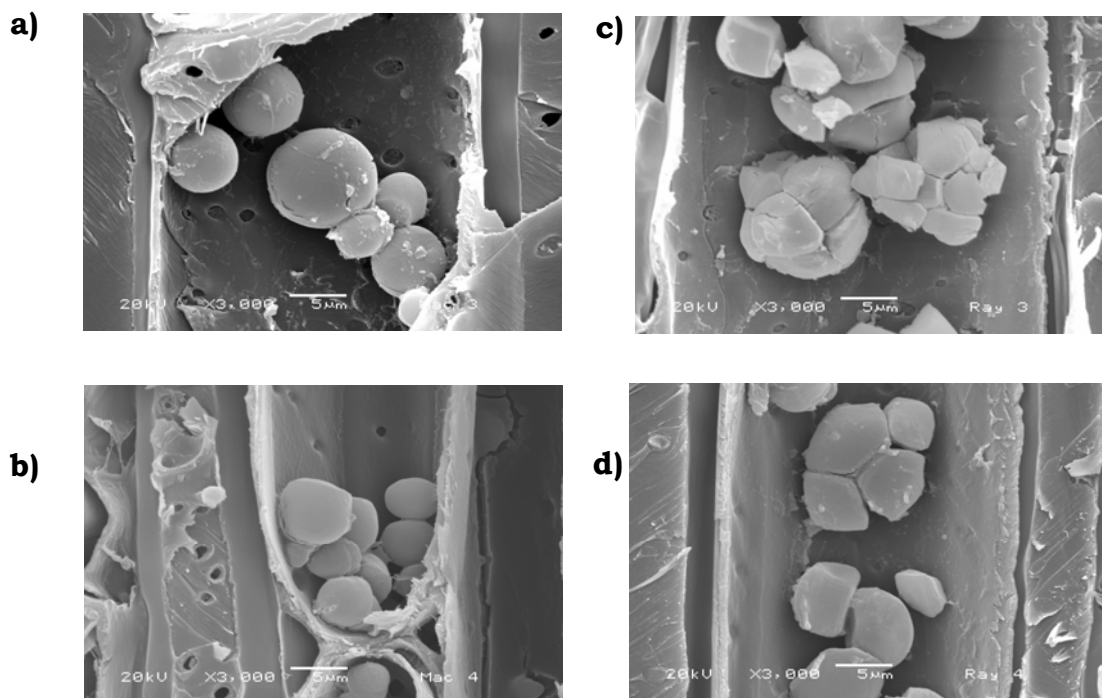


La Figura 4-12 muestra imágenes de SEM a 500X de las células del tejido parenquimatoso (Liese, 2004) y su variación a través del culmo de GAK en las secciones R2, R3 y R4.



**Figura 4-12 Variación de células parenquimas a través del culmo secciones R2, R3 y R4. (a,b,c) variedad Macana y (d,e,f) variedad Rayada amarilla.**

En las micrografías mostradas en la Figura 4-12 no se encuentra la sección R1 ya que en esta sección no se encuentran las células parénquimas que se analizan en las otras secciones. Se puede observar que a medida que se va alejando de la parte interna, estas células se hacen más angostas y su densidad aumenta. Las estructuras esféricas que se encuentran dentro de estas células son identificadas como almidones, principal fuente de almacenamiento de energía de las plantas (Alserbg, 1938; Barajas, *et al.*, 1997). Barajas *et al.* (1997) en su estudio de los cambios en el contenido de almidón presente en las plantas debido a los cambios climáticos, reportó que existen diferentes morfologías para los gránulos de almidón y que estas se encuentran relacionados con la especie analizada. La Figura 4-13 muestra los almidones encontrados en la GAK variedad Rayada Amarilla y Macana, se puede observar que las dos especies tienen almidones morfológicamente diferentes, mientras que en la variedad Macana tienen una simetría esférica, los almidones de la variedad Rayada amarilla se presentan como aglomerados.

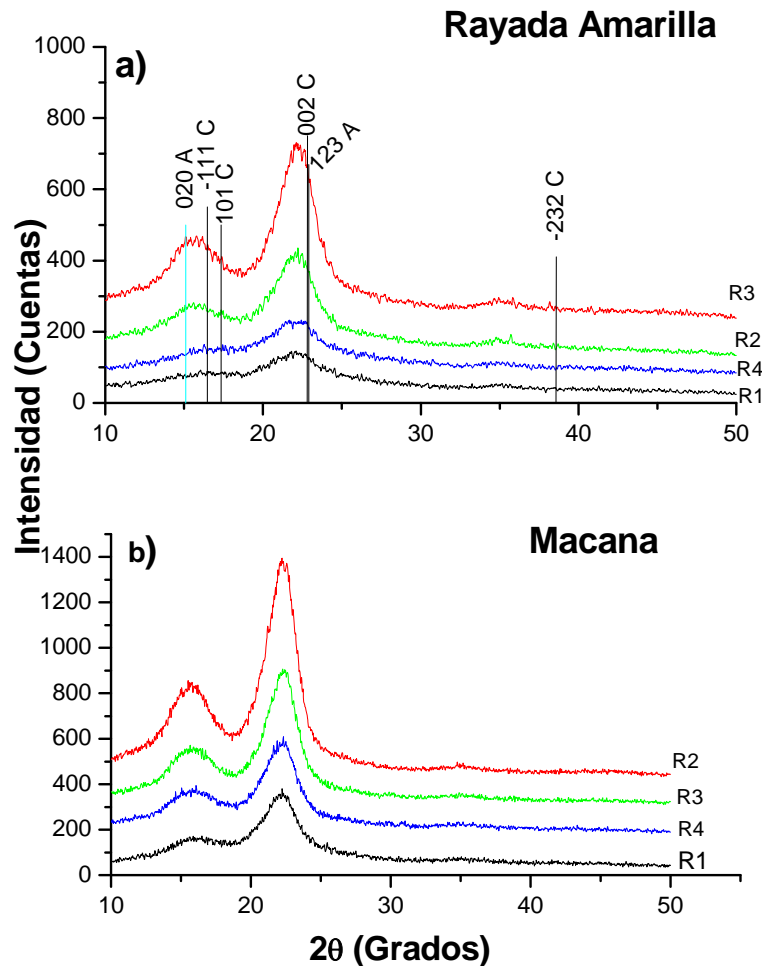


**Figura 4-13 Almidón presente en culmos de GAK (a,b) variedad Macana (c,d) variedad Rayada Amarilla.**

Los gránulos de almidón de morfología esférica también se encuentran en la especie *Coraria* perteneciente al género de las *Caesalpinia*, nativa de Colombia y propia de la cultura indígena del norte de ese País (Barajas, *et al.*, 1997). Este resultado como lo expresaron Barajas *et al.* (1997) es una herramienta para la clasificación de las diferentes variedades de GAK.

#### Difracción de Rayos - X

La Figura 4-14 muestra los difractogramas para las cuatro secciones del culmo en las variedades 4.14 a) Rayada Amarilla y 4.14 b) Macana.



**Figura 4-14** Difractogramas de cuatro secciones de GAK a) variedad Rayada Amarilla, b) Variedad Macana.

La identificación de las estructuras cristalinas de Celulosa (C) y Amilosa (A) se hace con los mismos patrones utilizados en el análisis XRD para el culmo completo.

La cristalinidad asociada con el ancho de la altura media de los picos de difracción demuestra que los compuestos presentes en el culmo difiere en cada una de las secciones, es decir, el culmo presenta las mismas estructuras cristalinas pero su ordenamiento es diferente; estando mas ordenadas en las secciones internas R2 y R3 y mas desordenadas en la sección R1 lo que se comprueba de las micrografías antes analizadas.

#### **4.6 Conclusiones**

La composición química de la *Guadua angustifolia* Kunth concuerda con la composición química de otros bambúes, específicamente los asiáticos y encuentran un grado de diferencia en el contenido de estos componentes, encontrando que compuestos químicos como la celulosa están en mayor porcentaje dentro de los culmos de *Guadua* con respecto a otros bambúes ya analizados, lo que convierte a este material en una fuente de biomasa que puede ser utilizado en diferentes industrias aún no exploradas.

La edad del bambú afecta significativamente su composición química se pudo establecer que los componentes químicos principales como la celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en los culmos de *Guadua* se degradan con la madurez de la misma.

La madurez de los culmos de *Guadua* refleja una disminución en su comportamiento mecánico. A medida que la *Guadua* envejece decrece su comportamiento mecánico, este comportamiento nos permite establecer que los culmos apropiados para las aplicaciones que involucren resistencia mecánica son culmos jóvenes.

La *Guadua* presenta estructuras cristalinas en su culmo como celulosa y amilosa. Estas estructuras muestran organizaciones diferentes y por ende

una orientación cristalográfica distinta en las dos direcciones principales del material. Este resultado permite corroborar que la Guadua, como la mayoría de los materiales naturales es un material anisotrópico.

Es posible tener una correlación entre algunos de los componentes químicos de los culmos de Guadua y el comportamiento mecánico de la misma. Para los culmos jóvenes se pudo identificar que la resistencia a la compresión se encuentra gobernada por la presencia de fibra soluble; a medida que la fibra soluble decrece el módulo de elasticidad de los culmos decrece. Por otro lado existe para los culmos jóvenes una correlación indirecta entre el módulo de elasticidad y la fibra insoluble, a medida que la fibra insoluble aumenta el módulo de elasticidad disminuye. De estos resultados podemos concluir que no solo las fibras insolubles son las que determinan el comportamiento mecánico de la Guadua, la matriz en la que se encuentran embebidas estas fibras juegan un papel importante para la resistencia mecánica.

El módulo de flexión en los culmos jóvenes no se pudo correlacionar con el contenido de ningún componente químico.

Para los culmos maduros se presenta una correlación indirecta entre el contenido de celulosa y hemicelulosa y el módulo de tensión. Es posible observar que cuando ambos componentes disminuyen el módulo de tensión incrementa. El bajo contenido de hemicelulosa permite que las fibras de celulosa sean más flexibles y por ende más resistentes a la flexión.

De los estudios realizados a las cuatro secciones de los culmos de *Guadua angustifolia* Kunth en la variedad Rayada amarilla y variedad Macana, podemos concluir:

La fibra insoluble muestra un comportamiento ascendente desde la pared interna hasta la pared externa, este comportamiento se observa en los dos culmos estudiados. El porcentaje en la última sección del culmo que se

establece como la corteza muestra un incremento con respecto a la primera sección de más de un 20% para ambos culmos.

Por medio de microscopía electrónica de barrido se pudo diferenciar entre la morfología de cada variedad de *Guadua angustifolia* Kunth, lo que permite una clasificación de los culmos y las edades de estos. Por otra parte, con esta técnica es posible observar la variación en la morfología de los principales tejidos de los culmos de *Guadua* a través de las cuatro secciones estudiadas.

El contenido de los componentes cristalinos de la *Guadua angustifolia*, no tienen una distribución homogénea a través del culmo debido a que en cada sección estudiada se tienen picos con diferentes anchos de banda media. Este contenido no presenta un comportamiento igual entre las variedades estudiadas.

Existen diferentes investigaciones donde se estudia la composición química, la respuesta mecánica, la taxonomía, la variación de las propiedades con la edad en especies de bambú, especialmente los asiáticos. En este trabajo de investigación, se desarrolló por primera vez un estudio completo tanto de propiedades mecánicas y composición química en esta especie de bambú además de la correlación entre estos dos estudios.

Con un completo conocimiento de las características físicas, morfológicas, anatómicas y mecánicas de los culmos de bambú y su evolución con la edad, es posible establecer las condiciones ideales de la *Guadua* para sus aplicaciones.

El conocimiento de esta especie de bambú, amplía el rango de sus aplicaciones, en algunos países como es el caso de países latinoamericanos donde se ha subvalorado su potencial.

---

# Referencias

Alonso, M.J. (2006), Conservación y restauración de la madera. Actas de los XI cursos monográficos sobre patrimonio histórico. pp 103-234.

Alserbg, C. (1938), Structure of starch granule. *Plant Physiology*. 13: 295-330.

American Bamboo Society (2006), Source List #26.

Andress, K.R. (1928), About the action of moderately concentrated nitric acid on cellulose. *Phys. Chem.*136: 279-288.

AOAC (2000), Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International, 17<sup>th</sup> Ed. Method 985.29. The Association: Gaithersburg, MD.

Askeland, D.; Phulé, P. (2004), *Ciencia e Ingeniería de Materiales*. 4<sup>th</sup> Edición. Ed THOMSON.

ASTM (2007). Standard Test Methods for Small Clear Specimens of Timber. D143-94.

Azmy, M.H. (1991), The structure and demography of *Gigantochloa scortechinii* gamble natural stand. *Bamboo Journal*. 9: 21- 26.

Banks, W.; Muir, D. (1980), Structure and chemistry of the starch granule. In: J. Preiss (ed). *The biochemistry of plants* 3. Academia Press. New Cork pp. 321-369.

Barajas, J.; Perez, L.; Chiang, F. (1997), Seasonal fluctuations of Starch in Wood and bark of trees from a tropical deciduous forest in Mexico. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. México. Ser. Bot.* 68(1): 7-19.

Becker, M.; Held, C. (2004), Proyecto Guadua Bamboo. Capítulo 8. *Ecología*.

Brady, G.S.; Clauser, H.R.; Vaccari, J.A. (2002), *Materials Handbook* 15<sup>th</sup> Edición. Mc Graw Hill. New York.

Cahuan, L.; Dhawan, S.; Gupta, S. (2000), Effect of age on anatomical and physicomechanical properties of three Indian bamboo species. *J. Of the T. D. A.* 46: 11-17.

Chabannes, M.; Ruel, K.; Yoshinaga, A.; Chabbert, B.; Jauneau, A.; Joseleau, J.P.; Boudet, A. M. (2001), "In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels". *Plant J.* 28: 271-28.

Cheng-Jung, L.; Ming-Jer, T.; Yung, S. (2006), Nondestructive evaluation techniques for assessing dynamic modulus of elasticity of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) lamina. *J Wood Sci.* 52: 342-347.

China Bamboo Center. Professional grower wholesale supplier. **TREE & BAMBOO**.

Ciro, H.; Osorio, J.; Vélez, J. (2005), Determination of the mechanical resistance to tension and shearing in the *Guadua Angustifolia* Kunth. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.* 58(1): 2709-2715.

Clark, L.G.; Cortés, G. (2004), A new species of *Otatea* from Chiapas, Mexico. *J of the American Bamboo Soc.* 18 (1): 1-6.



Corpocaldas-Cámara de Comercio de Manizales (2002). Microcluster de la Guadua. Manizales, Caldas.

Cortés, G. (2005), Guía de la colección de bambúes nativos de México. Instituto de ecología.

De Garmo, E.; Black, J.; Kohser, R. (1994), Materiales y procesos de Fabricación. 2<sup>th</sup> Edición Ed. Reverté S.A. pp 57-58.

Demiroz, A.; Unal, C.; Unal, B. (2008), Dimensional and Physical properties of plain knitted fabrics made from 50/50 Bamboo/Cotton Blended Yarns. *Fibers and Polymers*. 9(5): 588-592.

Deshpande, A.; Bhaskar, M.; Lakshmana, C. (2000), Extraction of Bamboo Fibers and Their Use as Reinforcement in Polymeric Composites. *J. of App. Polymer Science*. 76: 83-92.

Diaz, F. (2003), Pequeño manual de la Guadua. Trabajo de investigación.

Diccionario Forestal (2005), Sociedad Española de Ciencias Forestales 1<sup>th</sup> Edición. Ed. MUNDI-PRENSA.

Dieter, H.; Krobjilowski, A.; (2004), Improving the impact strength of natural fiber reinforced composites by specifically designed material and process parameters. *INJ Winter*.

Espinosa, D. (2004), La Cadena de la Gudua en Colombia. Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas. Bogotá Colombia.

Farris, S.; Piergiovanni, L.; Limbo, S. (2008), Effect of bamboo fiber and glucose syrup as a new ingredients in the manufacture of amaretti cookies. *Italian Journal of Science*. 20(1): 75-90.

Filgueiras, T.S.; Santos-Gonçalves, A.P. (2004), A checklist of the basal grasses and bamboo in Brazil (POACEAE). J of the American Bamboo Soc. 18 (1): 7-18.

Fuentes, J. (2001), Iniciación a la botánica. 1th Edición. Ed. MUNDI-PRENSA p 30.

Gallo, F. (2009), Sumidero habitable de CO<sub>2</sub>; biocompuesto de bambú para viviendas sostenibles. Arte y cemento: Revista de la construcción y su entorno. p 81.

Garcia, L.; Guinedo, A.; Peraza, C.; Palacios, P. (2003), La madera y su anatomía. Anomalías y defectos, estructura microscópica de coníferas y frondosas, identificación de maderas, descripción de especies y pared celular. 1<sup>th</sup> Edición. Ed. MUNDI-PRENSA.

Ghavami, K.; Rodrigues, C.S.; Paciornik, S. (2003), Bamboo: Functionally graded composite material. Asian J. Of Civil Eng. (Building and Housing). 40(1): 1-10.

Giraldo, E.; Sabogal, A. (1999), Una Alternativa sostenible: La Guadua corporación Autónoma Regional del Quindío (CRQ) Quindío Colombia.

Guy, A. (1980), Fundamentos de Ciencia de Materiales. Ed. Mc Graw Hill. p109. Mexico.

Haijun, L.; Sain – Mohini, M. (2003), High stiffness natural fiber-reinforced hybrid polypropylene composites. Polymer – plastics tech. and eng. 42(5): 853-862.

Higuchi, H. 1957. Biochemical studies of lignin formation, III. Physiologia Plantarum.10:633-648.

Hon, D., Shiraishi, N. (2000), Wood and cellulosic chemistry 2<sup>th</sup> Edición. Ed Marcel Dekker.

ICBO Evaluation Service, Inc. ACCEPTANCE CRITERIA FOR STRUCTURAL BAMBOO AC 162 (2000).

Imberty, A.; Chanzy, H.; Perez, S.; Burleon, A.; Tran, V. (1988), The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *J. Mol. Biol* 201:365-378.

Johnston, C. D. (2001), Fiber – Reinforced cements and concretes. – (Advances in concrete technology) V. 3. Gordon and Breach Science Publishers. LH Amsterdam.

Kleinn, C.; Morales-Hidalgo, D. (2006), An inventory of *Guadua (Guadua angustifolia)* bamboo in the coffee region of Colombia. *Eur J Forest Res.* 125 (4): 361–368.

Kolowski, T.T.; Keller, T. (1966), Food relations of woody plants. *Botanical review.* 32(4): 293-382.

Koshkin, N.I.; Shirkéovich, M.G. (1975), *Manual de Física Elemental.* 1<sup>th</sup> Edición. Ed. Mir.

Kozlowski, T.T. (1984), Plant responses to flooding of soil. *BioScience.* 34(3): 162-167.

Kramer, P.J., Kozlowski, T.T. (1960), *Physiology of trees.* Ed. Mac Graw Hill Co. New York.

Krevelen, D.W., Nijenhuis K. (2009), *Properties of polymers: Their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions.* Fourth completely revised Edition. Ed. Elsevier. Oxford, UK.

La *Guadua* nuestro recurso. Modulo 1. Taxonomía de la *Guadua*.

Li, X. (2004), Physical, Chemical, and Mechanical Properties of Bamboo and Its Utilization Potential For Fiberboard Manufacturing. Tesis, Louisiana State University, LA USA.

Liese, W. (1995), Ageing of bamboo culms. A review. Wood Science and Tech. 30(2): 77-89.

Liese, W. (2002), The Anatomy of Bamboo culms. Technical Report.

Liese, W. (2004), La preservación de un tallo de Bamboo, en relación a su estructura. Ponencia. Congreso internacional de la Guadua. Pereira, Colombia.

Liese, W.; Grosser, D. (1972), On the variability of fiber length of bamboo. Holzforschung. 26: 202-211.

Liese, W.; Kumar, S. (2003), Bamboo preservation compendium. Center for indian bamboo resource and technology. New Delhi.

Limaye, V.D. (1948), Effect of age and season of felling on the strength properties of bamboo. Ind. For. 74(1): 17-18.

Limaye, V.D. (1952), Strength of bamboo (*Dendrocalamus strictus*). Ind. For. Rec. 78: 558-575.

Londoño, X. (2002), Distribución, Morfología, Taxonomía, Anatomía, Silvicultura y Usos de los Bambúes del Nuevo Mundo. Modulo Guadua, Arquitectura, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Loretta, G.; Crescente, M.; Varone, L.; Fabrini, G.; Digiulio, E. (2008), Growth pattern and photosynthetic activity of different bamboo species growing in the Botanical Garden of Rome. Flora. 203: 77-84.

Lourdin, D.; Della Valle, G.; Colonna, P. (1995), Influence of amylase content on starch films and foams. Carbohydr. Polym. 27: 261-270.

Lucena, M.; Suarez, A.; Zamudio, I. (2009), Desarrollo de un material compuesto a base de fibras de bambú para aplicaciones aeronáuticas. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 3(1): 1107-1114.

Ludovico, A.; Albeiro, D.; Da silva, A.; Dal Fabbro, I.; Rodrigues, S. (2007), Técnica de Moiré Aplicada al análisis de esfuerzos de compresión en el Bambú GUADUA. *Maderas. Ciencia y Tecnología*. 9(3) 309-322.

Lybeer, B.; Koch, G. (2005), A topochemical and semiquantitative study of the lignification during ageing of bamboo culms (*PHYLLOSTACHYS VIRIDIGLAUCESCENS*). *IAWA Journal*. 26(1): 99-109.

Maekawa, E. (1976), Studies on Hemicellulose of Bamboo. *Wood Research* 59 – 60.

Martínez, A.T.; Camarero, S. Gutiérrez, A.; Bocchini P.; Galleta, G. C. (2001), Studies on Wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. *J Anal Appl pyrolysis*. 58-59: 401-411.

Meyers, M.A.; Chen, P.Y.; Yu-Min, A.; Seki, Y. (2008), Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Material Science*. 53: 1-206.

Montiel, M.; Guevara, E.; Jiménez, V. (2006), Ultraestructura del Bambú. *Guadua macclueri*. Poaceae: Bambusoideae de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 57(2): 35-42.

Mundo de la Guadua. <http://guaduayvida.blogspot.com/>

NREL National Renewable Energy Laboratory (2008), Preparation of Samples for Compositional Analysis. Technical report. Meth. 510-42619; 510-42618; 510-42622; 510-42621.

Obataya, E.; Kitin, P.; Yamauchi, H. (2007), Bending characteristics of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) *Wood Sci Technol*. 41(16): 385–400.

Okahisa, Y.; Yoshimura, T.; Imamura, Y. (2005), An application of the alkaline extraction – glucoamylase hydrolysis method to analyze starch and sugar contents of bamboo. *J Wood Sci.* 51: 542–545.

Osorio, J.A.; Vélez, J.M.; Ciro, H.J. (2007), Estructura interna de la Guadua y su incidencia en las propiedades mecánicas. *Dyna* (74) 153: 81-94.

Palonen, H. (2004), Role of Lignin in the enzymatic hydrolysis of Lignocellulose. pp 11-16.

Perea, J.; Villegas, J.; Bahamón, Y.; Cortés, M. (2003), Evaluación y documentación de prácticas sobresalientes sobre el manejo de la cosecha y maduración de la Guadua en el departamento del Huila. Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria PRONATA. Neiva, Colombia.

Primo, E. (1998), Química de los alimentos. Ed Síntesis S.A.

Ray, A.; Mondal, S.; Das, S.; Ramachandrarao, P. (2005), Bamboo – A functionally graded composite-correlation between microstructure and mechanical strength. *Jour. Of Mat. Sci.* 40: 5249 – 5253.

Salas-Salvado, J.; Bonada, A.; Trallero, R.; Saló, M. (2008), Nutrición y dietética clínica 2<sup>th</sup> Edición. Ed. ELSEVIER.

Salkind, N.J.; Escalona, R.L. (1997) Métodos de investigación 3<sup>th</sup> Edición. PRENTICE HALL. p. 225.

Schmid, S. (2002), Manufactura, ingeniería y tecnología. 4<sup>th</sup> Edición. Ed. Pearson p 68. México.

Segura, F.; Mejía, A.; Patiño, A.C. (2006), Delignificación selectiva del pasto KING GRASS usando basidiomicetos lignilíticos. *Rev. Salud pública y nutrición.* Edición especial 11.

Sekhar, A.C.; Rawat, B.S.; Bhartari, R.K. (1962), Strength of bamboo (*Bambusa mutans*). Ind. For. 88: 67-73.

SIG GUADUA. Sistema de Información Geográfica para la Guadua. La Guadua y sus Aportes al Ambiente.

Scurlock, J.M. (2000), BAMBOO: An overlooked biomass resource?. Biomass and Bioenergy. 19(4): 229-244.

Takeuchi, C.P.; González, C.E. (2007), Resistencia a la compresión paralela a la fibra de la *Guadua angustifolia* Kunth y determinación del módulo de elasticidad. Ingeniería y Universidad. 11: 89-103.

Tester, R.; Karkalas, J.; Qi, X. (2004), Starch composition, fine structure and architecture. Journal of cereal Science. 39: 151-165.

Tomalang, F.; Lopez, A.; Semara, J.; Casin, R.; Espiloy, Z. (1980), Properties and utilization of Philippine erect bamboo. International seminar on bamboo research in Asia. Singapur May 28-30.

Urquiza, H. (2009), Temas de Bioquímica para estudiantes de ciencias biomédicas. Junio Blog.

Valdez, A.; Cervantes, J.; Olayo, R; Herrera-Franco, P. (1999), Effect of fiber surface treatment on the fiber – matrix bond strength of natural fiber reinforced composites. Composites Part B: Eng. 30(3): 309-320.

Villegas, M. (2003), Guadua Arquitectura y diseño 1<sup>th</sup> Edición. Ed. Villegas Editores.

Walker, J. (2006), Primary Wood Processing 2<sup>th</sup> Edicion. Ed. Springer p. 23.

Wormald, J. (1979), Métodos de difracción. 1979 Ed. Reverté S.A.

Young, S.M.; Judd, W.S. (1992), Systematics of the *Guadua angustifolia* complex (Poaceae: Bambusoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 79(4):737-769.

Zhou, F.C. (1981), Studies on physical and mechanical properties of bamboo woods. *J. of Nanjing Tech. College of For. Products*. 2: 1 -32.

Zhou, Z. (1992), STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUENTS OF BAMBOO LEAVES. *J Natural Product Research and Development*.

Ziegler, A.M.; Walker, K.R.; Anderson, E.J.; Kauffman, E.G; Ginsburg, R.N.; James, N.P. (1974), Principles of benthic community analysis. *Comp. Sed. Lab. University of Miami. Sedimenta* 4: 1.1-12.7.

Zisheng, L.; Xiaoling, X.; Bifang, Y. (2007), Accumulation of lignin and involvement of enzymes in bamboo shoot during storage. *Eur Food Res Technol*. 226: 635–640.



# **ANEXO 1**

*Innovation for Our Energy Future*

# Preparation of Samples for Compositional Analysis

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

**Issue Date: 8/06/2008**

B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, A. Sluiter  
J. Sluiter, and D. Templeton

**Technical Report**  
**NREL/TP-510-42620**  
**Revised August 2008**

NREL is operated by Midwest Research Institute • Battelle

Contract No. DE-AC36-99-GO10337



# Preparation of Samples for Compositional Analysis

*Technical Report*  
NREL/TP-510-42620  
Revised August 2008

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

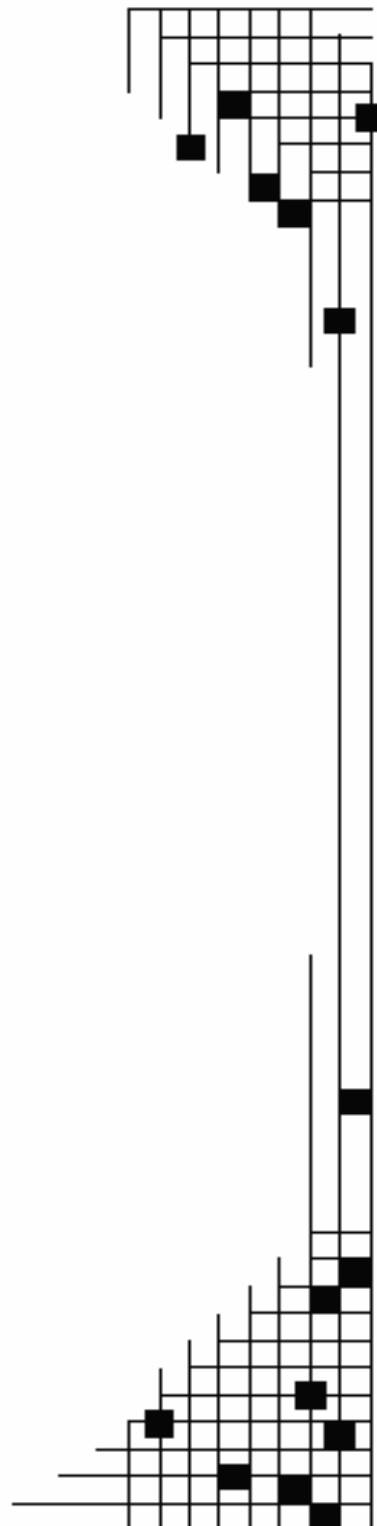
**Issue Date: 8/06/2008**

B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, A. Sluiter,  
J. Sluiter, and D. Templeton

**National Renewable Energy Laboratory**  
1617 Cole Boulevard, Golden, Colorado 80401-3393  
303-275-3000 • [www.nrel.gov](http://www.nrel.gov)

Operated for the U.S. Department of Energy  
Office of Energy Efficiency and Renewable Energy  
by Midwest Research Institute • Battelle

Contract No. DE-AC36-99-GO10337



## DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods ("Methods") are provided by the National Renewable Energy Laboratory ("NREL"), which is operated by the Midwest Research Institute ("MRI") for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

# **Procedure Title: Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure**

## **1. Introduction**

- 1.1 This procedure describes a reproducible way to convert a variety of biomass samples into a uniform material suitable for compositional analysis. The National Renewable Energy Laboratory (NREL) LAPs for compositional analysis have been optimized using samples with a specific particle size range and moisture content. All NREL biomass compositional analysis procedures assume that the samples have been prepared to meet these specifications. Deviations from these parameters may invalidate assumptions made in those methods and thereby introduce errors in the analysis. Procedures are listed that are suitable for the preparation of biomass feedstocks and a variety of biomass-derived materials. Representative sampling of biomass samples is also addressed
- 1.2 This procedure is substantially similar to ASTM Standard Practice E 1757 – 01. Parts of this procedure are similar to TAPPI method number T264 and NFTA method A 1.1.
- 1.3 This procedure describes methods for drying, size reduction, obtaining samples with a uniform particle size and representative sampling of biomass samples.

## **2. Scope**

- 2.1 This method is appropriate for the preparation of most types of biomass and biomass-derived solids for compositional analysis.
- 2.2 This procedure is not intended for materials that will already pass through a 20-mesh sieve.
- 2.3 This procedure is not intended for materials that cannot be dried by the described methods to a total solids content of greater than 90% of the sample's oven dried weight.
- 2.4 All analyses shall be performed according to the guidelines established in an appropriate Quality Assurance Plan (QAP).

## **3. Terminology**

- 3.1 *Ambient conditions*- a temperature of 20°C to 30°C (68°F to 85°F), less than 50% relative humidity.
- 3.2 *Prepared biomass*- biomass that has been prepared according to this practice.
- 3.3 *Oven dry weight (ODW)*- the weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing

#### **4. Significance and Use**

- 4.1 This procedure is used, in conjunction with other procedures, to determine the chemical composition of biomass samples.
- 4.2 This procedure describes drying, size reduction, and representative sampling methods that must be performed prior to analysis for many other constituents.

#### **5. Interferences**

- 5.1 This procedure produces biomass samples with a particle size range. The NREL procedures for biomass compositional analysis have been optimized for samples with this particle size range. Deviation to a smaller particle size may result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to excessive carbohydrate degradation. Deviation to a larger particle size may also result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars.
- 5.2 This procedure produces samples with moisture contents below 10%. The NREL procedures for biomass compositional analysis have been optimized for samples with low moisture contents. Higher moisture content in biomass samples will alter the effective acid concentration in the concentrated acid hydrolysis steps. Lowering the acid concentration may result in a low bias in carbohydrate content due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars. Incomplete hydrolysis leaves oligomeric sugars, which are not soluble in 4% acid and are incorrectly counted as acid insoluble residue in these procedures, introducing a consequent high lignin bias.
- 5.3 This procedure assumes that chemical fractionation does not occur during the optional sieving steps and that the chemical composition of any fines removed from the sample is substantially similar to the composition of the bulk sample. Sieving can be performed if the ash content according to LAP "Determination of Ash in Biomass" is high. Sieving may also be performed if homogeneous particle size is critical. However, if the entire biomass sample needs to be analyzed, sieving can frequently cause fractionation and should not be performed.

#### **6. Apparatus**

- 6.1 Large table or drying rack for air drying biomass (method A only).
- 6.2 Convection oven capable of maintaining  $45 \pm 5^\circ\text{C}$  (method B only).
- 6.3 Freeze-Drier - System with vacuum chamber and pump capable of maintaining a pressure of  $<1$  torr and a cold finger in the chamber capable of maintaining a temperature of  $-50^\circ\text{C}$  (method C only).
- 6.4 Balance, sensitive to 0.1 g.
- 6.5 Standard laboratory knife mill with 2 mm screen. A Wiley Mill, size No. 4 with a 2-mm screen, is suitable for samples  $>20$  g, and the intermediate

model Wiley Mill, with 1-mm screen, is suitable for samples <20 g that will not be sieved. Equivalent knife mills are acceptable.

6.6 Sieve Shaker that provides motion in both horizontal and vertical axes- for optional sieving step

6.6.1 Sieve Set, No. 20 (850  $\mu\text{m}$ ), No. 80 (180  $\mu\text{m}$ ) stackable sieves with lid and bottom pan. Sieves and bottom pan should be 8.9 cm (3 1/2 in.) in height. Sieves should conform to ASTM Specification E 11.

6.6.2 Riffle Sampler with Pans — A manual sample divider that splits the milled biomass into two or more equivalent sub-samples. Riffle divisions should be between 6.4 mm and 12.7 mm (1/4 to 1/2 in.) with at least twenty-four riffle openings. The feed chute and riffles should have a slope of at least 60°. Collection pans, one to pour the sample into the riffler, and two or more to collect the sub-samples.

## **7. Reagentes and Materials**

7.1 Reagents

7.1.1 For lyophilization method only

7.1.1.1 Acetone, electronic grade.

7.1.1.2 Dry ice, ground.

7.2 Materials

7.2.1 Assorted trays and containers as appropriate for the selected drying method.

## **8. ES&H Considerations and Hazards**

8.1 Milling and sieving actions both produce large amounts of dust. This dust can be a nuisance, hazard, or irritant. Use appropriate respiratory protection and eye protection as needed.

8.2 If excessive amounts of dust are allowed to become airborne, a potential explosion hazard is possible. Provide appropriate dust control measures as needed.

8.3 Follow all applicable NREL chemical handling procedures.

8.4 This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.

## **9. Sampling Test Specimens and Test Units**

9.1 This procedure describes sampling, and sample preparation required prior to analysis for ash, extractives, carbohydrates, lignin, and protein.

## **10. Procedure**

**Prepare the biomass sample using one of the three methods described below. Use either 10.1, 10.2, or 10.3.**

10.1 **Method A - Air-drying.** This method is suitable for the preparation of large quantities (>20 g) of field-collected samples into a form appropriate for compositional analysis. This method is suitable for drying materials where ambient humidity allows the sample to air-dry to a moisture content below 10% as measured using LAP “Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples”.

10.1.1 Biomass samples must first be available as pieces with overall dimensions less than 5 by 5 by 0.6 cm (2 by 2 by 1/4 in.). Stems or twigs should not exceed 0.6 cm (1/4 in.) diameter. It is recommended that wastepaper should be shredded into pieces less than 1 cm (3/8 in.) wide. Twigs, straw and wastepaper should not exceed 20 cm (8 in.) in length to facilitate milling.

10.1.2 The biomass material should be spread out on a suitable surface and allowed to air-dry prior to any milling. Do not pile the material deeper than 15 cm. Turn the material at least once per day to ensure even drying and inhibit microbial growth in samples.

10.1.3 Following NREL LAP “Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples” measure the solids content of the biomass sample once every 24 hours.

10.1.4 The material is considered dried when the moisture content is less than 10% by weight and the change in weight is less than 1% in 24 h.

10.2 **Method B - Convection oven drying.** An alternative to air-drying is to dry the biomass sample in a convection oven at temperatures no greater than 45°C. This method may be used for very wet biomass samples that are at risk for microbial growth during drying, wet pretreated biomass, samples that would not be stable during prolonged exposure to ambient conditions, or for drying materials when ambient humidity does not allow the sample to air-dry to a moisture content below 10% as measured using LAP “Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples”. This drying method is suitable for small samples of biomass (<20 g).

**Note: This method may cause some biomass samples to change, particularly pretreated biomass. This procedure should only be used when air-drying is impossible.**

10.2.1 Select a container suitable for oven drying the biomass sample and dry this container at  $45 \pm 3^\circ\text{C}$  for a minimum of 3 h.

10.2.2 Place the container in a desiccator and allow the container to cool to room temperature.



- 10.2.3 Weigh the container to the nearest 0.1 g and record this weight as Wt.
- 10.2.4 Place the biomass material into the dried container to a maximum depth of 1 cm.
- 10.2.5 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as Wi.
- 10.2.6 Place the container and biomass in a drying oven maintaining the temperature at  $45 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Allow the material to dry for 24 to 48 h.
- 10.2.7 Remove the container and biomass from the drying oven, place in a desiccator and allow the sample to cool to room temperature.
- 10.2.8 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as Wf.
- 10.2.9 Return the sample to the drying oven, maintaining the temperature at  $45 \pm 3^{\circ}$ . Keep the sample in the drying oven at  $45 \pm 3^{\circ}\text{C}$  for minimum of 4 h .
- 10.2.10 Remove the container and biomass from the drying oven, place in a desiccator and allow the sample to cool to room temperature
- 10.2.11 Weigh each sample to the nearest 0.1 mg and record this weight.
- 10.2.12 Return the samples to the drying oven at  $45^{\circ}\text{C}$  for 1 h.
- 10.2.13 Remove the container and biomass from the drying oven, place in a desiccator and allow the sample to cool to room temperature.
- 10.2.14 Weigh each sample to the nearest 0.1 mg and record this weight.
- 10.2.15 Repeat steps 10.3.12 through 10.3.14 until the change in the mass of the biomass is less than 1% in one hour.
- 10.2.16 Use calculations in section 11 to determine the total solids obtained with this method.

10.3 **Method C - Lyophilization.** An acceptable alternative to air-drying (10.1) or drying in a convection oven (10.2) is lyophilization (freeze-drying) of the sample. This method is suitable for very wet biomass that is at risk for microbial growth during drying, wet

pretreated biomass, samples that would not be stable during prolonged exposure to ambient conditions, or for drying materials when ambient humidity does not allow the sample to air-dry to a moisture content below 10% as measured using LAP "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples". This test method is also suitable for materials that are heat sensitive and would degrade if subjected to the drying oven in Test Method B. This drying method is suitable for small samples of biomass (<20 g).

- 10.3.1 Weigh a suitable freeze-drier container to the nearest 0.1 g and record this weight as Wt.
- 10.3.2 Place the biomass material in the container. For solid samples, do not fill the container more than half full. For liquid or slurry

materials, limit the sample to the amount of material that gives a uniform coating of around 0.5 cm on the walls of the container when the sample is frozen.

- 10.3.3 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as  $W_i$ .
- 10.3.4 Combine the dry ice and acetone in a shallow container suitable for shell freezing.
- 10.3.5 Place the freeze dry flask containing the biomass sample in the dry ice acetone mixture. Slowly turn the container (10 r/min) to freeze the material into a uniform layer on the walls of the container.
- 10.3.6 Immediately place the container on the freeze-drier and allow the material to dry until all visible traces of ice and frost are gone from the sample. This process typically takes 12 h for small (<20 g) samples, and can extend to more than 96 h for large samples (>250 g).
- 10.3.7 Remove the container and biomass from the freeze drier.
- 10.3.8 Allow the sample to warm to room temperature.
- 10.3.9 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as  $W_f$ .
- 10.3.10 Use calculations in section 11 to determine the total solids obtained with this method.

### **Mill the dry sample, and sieve if desired.**

#### **10.4 Milling**

- 10.4.1 Feed the air-dried biomass into the knife-mill, and mill until the entire sample passes through the 2 mm screen in the bottom of the mill, or a 1mm screen on small mills. Laboratory mills can generate enough heat to damage biomass samples. Monitor the mill closely and allow the mill to cool to room temperature between batches if necessary.
- 10.4.2 If the prepared sample is not analyzed immediately after sieving milling, the sample should be stored in an airtight container or sealable polyethylene bag and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until needed

#### **10.5 Optional sieving**

Note: Sieving can be performed if the ash content according to LAP “Determination of Ash in Biomass” is high. Sieving may also be performed if homogeneous particle size is critical. **However, if the entire biomass sample needs to be analyzed, sieving can frequently cause fractionation and should not be performed.**

- 10.5.1 Stack the sieves in the following order, starting at the bottom: solid catch pan, 80- mesh sieve, 20-mesh sieve.
- 10.5.2 Place the milled biomass in the 20-mesh sieve. The sample should be no more than 7 cm deep in the 20-mesh sieve. The milled sample may be processed in batches if necessary.

- 10.5.3 Place the cover on the sieve stack and secure the stack in the sieve shaker.
- 10.5.4 Shake the sieves for  $15 \pm 1$  min.
- 10.5.5 The fraction retained on the 20-mesh sieve (+20 mesh fraction) should be reprocessed (steps 10.4.1) until no biomass remains on the 20-mesh sieve.
- 10.5.6 The fraction retained on the 80-mesh sieve (-20/+80 mesh fraction) should be retained for compositional analysis.
- 10.5.7 The material in the solid catch pan is the fines (-80mesh) fraction. Retain this material for ash analysis.
- 10.5.8 Combine all of the -20/+80 mesh batches. Weigh the combined -20/+80 mesh fraction to the nearest 0.1 g. Record the weight of the -20/+80 mesh fraction as Wt<sub>20/80</sub>.
- 10.5.9 Combine all of -80 mesh batches. Weigh the combined fines to the nearest 0.1 g. Record the weight of fines fraction as Wt<sub>80</sub>.
- 10.5.10 If multiple sieved samples were combined they must homogenized. Pour the -20/+80 mesh fraction into the riffle sampler.
  - 10.5.10.1 The sample must be distributed evenly onto all the riffle openings. A pan, as wide as the riffle opening, should be used. Pour the sample evenly off the entire side of the pan and not from the end or the corner. Do not transfer the biomass sample from a narrow-mouth container such as a jar.
- 10.5.11 Recombine the riffled sub-samples.
- 10.5.12 Repeat steps 10.5.10 through 10.5.11 a total of four times.
- 10.5.13 Determine the total solids content (TS) of both the -20/+80 mesh fraction and the fines fraction using LAP "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples". Record the total solids of the -20/+80 mesh fraction as TS<sub>20/80</sub>. Record the total solids content of the fines as TS-80.
- 10.5.14 Determine the ash content of each fraction using LAP "Determination of Ash in Biomass". Record the ash content of the -20/+80 mesh fraction as Ash<sub>20/80</sub>. Record the ash content of the fines as Ash-80.
- 10.5.15 Using the equations in Section 11, calculate the percent of each fraction in the original, biomass sample. The fraction weight percent is used to reconstruct the composition of the original biomass sample.
- 10.5.16 If the total sample needs to be subdivided into smaller samples, use the riffler to make this separation.
- 10.5.17 If the prepared sample is not analyzed immediately after sieving and riffling, the sample should be stored in an airtight container or sealable polyethylene bag and kept at -20°C until needed.

## 11. Calculations

11.1 To calculate the fraction percent of -20/+80 mesh fraction, use the following equation:

$$Fraction_{20/80} \% = \left( \frac{Wt_{20/80}}{Wt_{20/80} + Wt_{80}} \right) \times 100$$

Where:

Wt 20/80 = weight of -20/+80 mesh fraction (g)

Wt80 = weight of fines fraction (g)

11.2 To calculate the fraction percent of -80 mesh fraction, use the following equation:

$$Fraction_{80} \% = \left( \frac{Wt_{80}}{Wt_{20/80} + Wt_{80}} \right) \times 100$$

Where:

Wt 20/80 = weight of -20/+80 mesh fraction (g)

Wt80 = weight of fines fraction (g)

11.3 To calculate the percent of total solids obtained by drying at 45°C (Method B), use the following equation:

$$\%T_{45} = \left( \frac{(W_f - W_t)}{(W_i - W_t)} \right) \times 100$$

Where:

% T45 = percent total solids of a sample oven dried at 45°C,

Wt = tare weight of freeze-drier container,

Wi = initial weight of container and sample

Wf = final weight of container and sample.

11.4 To calculate the percent of total solids obtained by freeze drying (Method C), use the following equation:

$$\%T_{fd} = \left( \frac{(W_f - W_t)}{(W_i - W_t)} \right) \times 100$$

Where:

% Tfd = percent total solids of a freeze-dried sample,

Wt = tare weight of freeze-drier container,

Wi = initial weight of container and sample

Wf = final weight of container and sample.

- 11.5 For larger biomass samples that must be prepared in batches, record the total percent solids of each fraction as well as the combined weight of the biomass in each fraction, (Wf – Wt).
- 11.6 To calculate the composition of constituent X in the original biomass sample, use the following equation:

$$\%X_{Original} = (\%X_{-20/+80} \times Fraction_{20/+80} \%) + \left( \%X_{-20/+80} \times \left( \frac{100 - \%Ash_{80} + \%Ash_{20/+80}}{100} \right) \times Fraction_{80} \% \right)$$

## 12. Report Format

- 12.1 Report weight percent prepared biomass and weight percent fines. Report results on an oven dry weight basis.

## 13. Precision and Bias

- 13.1 Repeatability – Duplicate determinations on splits of the gross sample, by the same operator, using the same sieves, should duplicate the percent mass fractions within 2% absolute.
- 13.2 Reproducibility – Duplicate determinations on splits of the gross sample, by different operators, using the same sieves, should duplicate the percent mass fractions within 2% absolute.
- 13.3 Bias – Since there is not an appropriate standard reference material, no statement about bias can be made.
- 13.4 Round robin testing – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

## 14. Quality Control (all items bellow, missing)

- 14.1 Reported Significant Figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan, see LAP “Rounding and Significant Figures”.
- 14.2 Replicates: not applicable
- 14.3 Blank: not applicable
- 14.4 Relative percent difference criteria: not applicable
- 14.5 Calibration verification standard: not applicable
- 14.6 Sample size: not applicable
- 14.7 Sample storage: If the prepared biomass sample is not analyzed immediately after sieving and riffing, the sample should be stored in an air-tight container or sealable polyethylene bag and kept at –20°C until needed.

- 14.8 Standard storage: not applicable
- 14.9 Standard preparation: not applicable
- 14.10 Definition of a batch: not applicable
- 14.11 Control charts: not applicable

## **15. Appendices**

- 15.1 None

## **16. References**

- 16.1 Moore, W., and D. Johnson. 1967. Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture
- 16.2 ASTM E 1757 - 01 "Standard Practice for Preparation of Biomass for Compositional Analysis" In 2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International.
- 16.3 NREL Laboratory Analytical Procedure "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples"
- 16.4 NREL Laboratory Analytical Procedure "Determination of Ash in Biomass"
- 16.5 TAPPI Test Method T264 cm-97, "Preparation of wood for chemical analysis" In Tappi Test Method 2002-2003. Atlanta, GA: Technical Association of the Pulp and Paper Industry
- 16.6 National Forage Testing Association Methods, available on-line at [http://www.foragetesting.org/lab\\_procedures.php](http://www.foragetesting.org/lab_procedures.php), Omaha, Nebraska, National Forage Testing Association, Accessed April 2004
- 16.7 Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366

# **ANEXO 2**



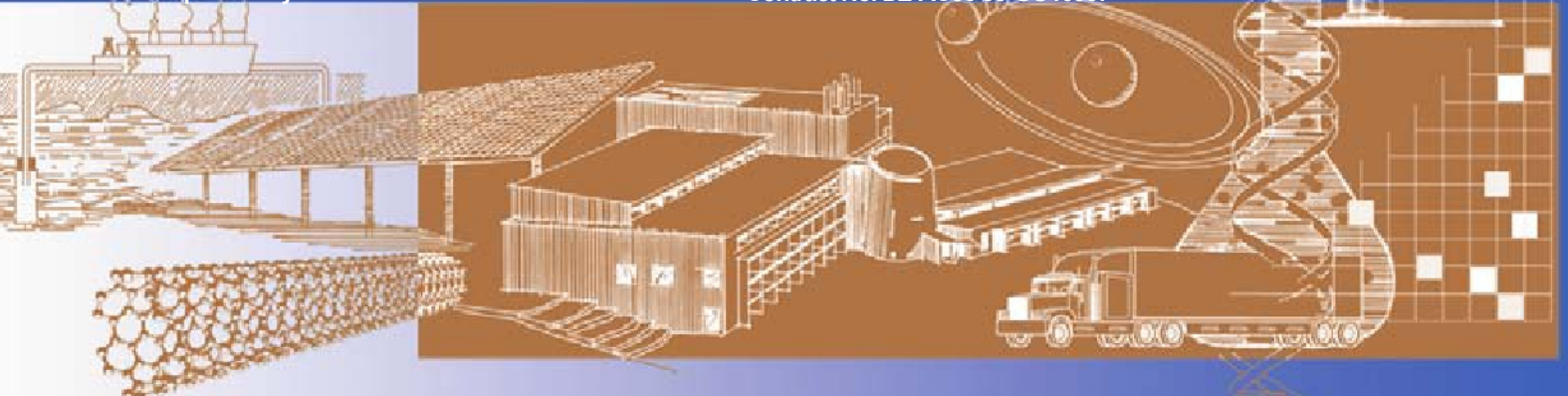
# Determination of Extractives In Biomass

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

**Issue Date: 7/17/2005**

A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and  
D. Templeton

*Technical Report*  
**NREL/TP-510-42619**  
January 200\*8





# Preparation of Samples for Compositional Analysis

*Technical Report*  
NREL/TP-510-42620  
Revised August 2008

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

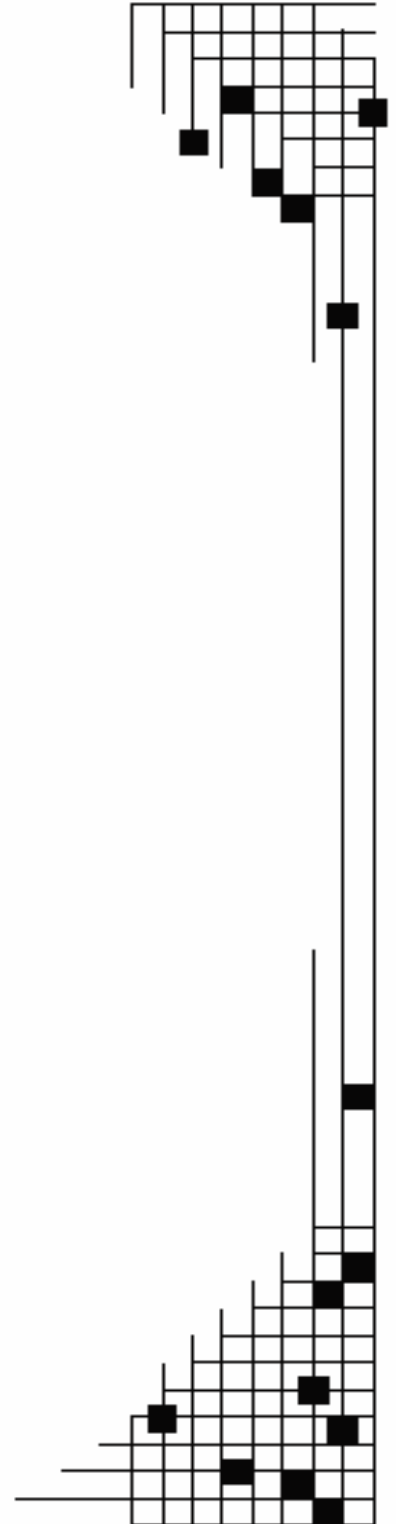
**Issue Date: 8/06/2008**

A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter,  
and D. Templeton

**National Renewable Energy Laboratory**  
1617 Cole Boulevard, Golden, Colorado 80401-3393  
303-275-3000 • [www.nrel.gov](http://www.nrel.gov)

Operated for the U.S. Department of Energy  
Office of Energy Efficiency and Renewable Energy  
by Midwest Research Institute • Battelle

Contract No. DE-AC36-99-GO10337



## DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods (“Methods”) are provided by the National Renewable Energy Laboratory (“NREL”), which is operated by the Midwest Research Institute (“MRI”) for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

# **Procedure Title: Determination of Extractives in Biomass**

## **Laboratory Analytical Procedure**

### **1. Introduction**

It is necessary to remove non-structural material from biomass prior to analysis to prevent interference with later analytical steps. This procedure uses a two-step extraction process to remove water soluble and ethanol soluble material. Water soluble materials may include inorganic material, non-structural sugars, and nitrogenous material, among others. Inorganic material in the water soluble material may come from both the biomass and any soluble material that it is associated with the biomass, such as soil or fertilizer. No attempt is made to distinguish the source of the inorganic material. Ethanol soluble material includes chlorophyll, waxes, or other minor components. Some biomass may require both extraction steps, while other biomass may only require exhaustive ethanol extraction.

Refer to LAP-010 or ASTM Standard Test Method E 1690 “Determination of Ethanol Extractives in Biomass” for extraction procedures for isolation and characterization of extractives

This procedure covers the determination of soluble non-structural materials in a biomass sample. The results are reported, on a dry weight basis, as a weight percentage of the biomass. Extractives percentages are measured and used to convert compositions from an extractives-free basis to and as-received basis. Determining the amount of water extractable sucrose is also covered. This LAP should be used in conjunction with other assays to determine the total composition of biomass samples as described in LAP “Summative Mass Closure for Biomass Samples”. This procedure should be performed prior to LAP “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.

### **2. Scope**

- 2.1 This procedure has been optimized for the removal of extractives in biomass.
- 2.2 The decision to utilize a two-step or one step extraction should be made based on biomass type.
  - 2.2.1 The two-step extraction should be used to quantify extractives in biomass samples that contain a significant amount of water soluble material, or biomass that has water soluble components of interest. Corn stover is an example of biomass that should be subjected to a two-step extraction process, as the water soluble portion of the biomass is significant and the water soluble material includes quantifiable carbohydrates.
  - 2.2.2 Ethanol only extractions should be used for samples that have little or no water extractable material or when no water soluble components

need to be quantified. Examples include hardwoods and softwoods. These samples should be subjected to exhaustive ethanol extraction only.

- 2.2.3 This procedure should not be applied to other types of biomass without appropriate investigations as to the applicability of the method, including samples with partially ethanol-soluble fats.

### 3. Terminology

*Extractives*- The material in a biomass sample that is soluble in either water or ethanol during exhaustive extraction. Extractives include non-structural components of biomass samples that could potentially interfere with the down stream analysis of the biomass sample

*Non-structural components*- Non-chemically bound components of biomass that include but are not limited to sucrose, nitrate/nitrites, protein, ash, chlorophyll, and waxes.

*Extractives-free biomass*- Biomass after exhaustive water and ethanol extraction.

*Soxhlet cycle*- One soxhlet cycle is an amount of time measured from the start of one siphoning until the start of the next siphoning from the extractor.

*Exhaustive extraction*- An exhaustive water extraction is complete when most or all of the water extractable material has been extracted from the biomass. For the Soxhlet method, this is usually 6-24 hours. An exhaustive ethanol extraction is usually complete in 24 hours using the Soxhlet method.

*Oven dry weight (ODW)*- The weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing, or the weight of glass or porcelain apparatus dried in a  $105 \pm 5$  °C drying oven to a constant weight.

### 4. Significance and Use

This procedure is used, in conjunction with other procedures to determine the chemical composition of biomass samples, see LAP “Summative Mass Closure for Biomass Samples”.

Removal of extractives prior to analysis for carbohydrates and lignin improves precision of those methods. Irreproducible partitioning of extractives introduces errors in those methods, see Milne et al. (1992)

### 5. Interferences

Samples that are moldy or aged may contain structural materials that have been modified and are now soluble in water or ethanol.

Failure to remove extractable materials may result in an error in structural sugar values. Hydrophobic extractives inhibit penetration of the sulfuric acid into the sample resulting in incomplete hydrolysis.

Failure to remove extractable material may result in falsely high lignin values when unhydrolyzed carbohydrates condense with the acid insoluble lignin

## 6. Apparatus

Analytical balance, accurate to 1 mg or 0.1 mg.

Medium to large capacity oven set to  $105 \pm 5$  °C for glassware drying.

Vacuum oven set to  $40 \pm 2$  °C *or* drying oven set to  $45 \pm 2$  °C.

Apparatus for extraction, either Soxhlet or automatic

Apparatus for Soxhlet extraction.

Glass Soxhlet extraction tubes of suitable size (capacity 85 mL).

Heating mantles, suitable for 500 mL boiling flasks.

Condensers with appropriate fitting for Soxhlet tubes and a source of chilled water or other cooling system.

Single thickness cotton cellulose thimbles, 94 mm external length by 33 mm internal diameter (Alundum thimbles, medium porosity, of appropriate size for Soxhlet tube may also be used)

250 mL glass rotary evaporator trap, optional.

Apparatus for automatic extraction.

Dionex Accelerated Solvent Extractor, model 200

Extraction cells, 11ml

Appropriately sized glass or polypropylene filters and tamping rod. Polypropylene filter cloth may be used to cut filters, and is available from Sigma-Aldrich, catalog #Z557722, W 102 cm permeability factor activity 60 cfm. Polypropylene filters should not be used for incompatible solvents, such as hexane.

Evaporator, either apparatus listed or equivalent device suitable for evaporating water and ethanol

Rotary evaporator with trap and water bath set to  $40 \pm 5$  °C.

Automatic solvent removal system, such as TurboVap II, with appropriate tubes.

YSI analyzer with appropriate membranes or equivalent sucrose quantification method

## 7. Reagents nad materials

Reagents

Water, HPLC grade

Ethyl alcohol, 190 proof, USP grade

## Materials

### Materials necessary for Soxhlet extraction

Boiling flasks, round bottom, 500 mL capacity, 24/40 joint, equal to the number of extractions desired

Teflon boiling chips or stir bars (stir bars may only be used with heating mantles equipped with stirring capacity).

Cellulose filter paper, medium porosity, of appropriate size.

Buchner funnels, for paper diameter 70 mm or larger

200 mL volumetric flasks, necessary for sucrose determination only.

Desiccator(s) containing desiccant, of a volume large enough to accommodate appropriate glassware.

### Materials necessary for automatic extraction

Collection vials with lids and septa, sized to fit extraction cell volume

Extraction cell filters, either glass fiber or polypropylene, cut to fit if necessary

## 8. ES&H Considerations and Hazard

Ethyl alcohol is flammable.

Follow all applicable NREL chemical handling procedures

## 9. Sampling, Test Specimens and Test Units

Follow LAP “Preparation of Biomass for compositional Analysis” prior to analysis.

Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.

The test specimen should consist of 5-20 grams of milled sample obtained in such a manner as to ensure that the sample is representative of the entire lot of material. A minimum of 8 g of extracted sample is required for complete compositional analysis.

## 10. Procedure

### Prepare the sample for extraction.

The moisture content of a biomass sample can change rapidly when exposed to air.

Weigh samples for total solids determination (LAP “Determination of Total Solids and Moisture in Biomass”) at the same time as the samples for the extractives determination to avoid errors due to changes in humidity

### *Extract the sample- Soxhlet method only*

#### Prepare the apparatus for extraction.

Dry boiling flasks and other relevant glassware (bump traps and automatic evaporator glassware if desired) in a  $105 \pm 5$  °C drying oven for a minimum of 12 hours. Remove the glassware and allow it

to come to room temperature in a desiccator. Add boiling stones (or stir bars if using heating mantles with stirring capacity) to the flasks, label clearly, and record the oven dry weight (ODW) to the nearest 0.1 mg.. If significant foaming is expected during water extractions, the ODW of the bump traps may also be recorded.

Add 2-10 g of sample to a tared extraction thimble. Record the weight to the nearest 0.1 mg. The amount of sample necessary will depend on the bulk density of the biomass. The height of the biomass in the thimble must not exceed the height of the Soxhlet siphon tube. If the biomass height does exceed the siphon height, incomplete extraction will occur. Label the top edge of the thimble with a pencil.

Assemble the Soxhlet apparatus. Add a 250 mL bump trap between the receiving flask and the Soxhlet tube to control foaming if necessary. Insert the thimble into the Soxhlet tube.

#### **Analyze the sample for water extractives (if necessary)**

Add  $190 \pm 5$  mL of HPLC grade water to the tared receiving flask. Place the receiving flask on the Soxhlet apparatus. Adjust the heating mantles to provide a minimum of 4-5 siphon cycles per hour.

Reflux for 6-24 hours. The reflux time necessary will depend on the removal rate of components of interest, the temperature of the condensers, and the siphon rate. In some biomass, such as corn stover, the reflux time is usually around eight hours, and any remaining water soluble material will be extracted during the ethanol extraction.

When reflux time is complete, turn off the heating mantles and allow the glassware to cool to room temperature.

If a successive ethanol extraction is to be performed, leave the thimble in the Soxhlet extractor, removing as much residual water from the Soxhlet tube as possible. If an ethanol extraction is not necessary, remove the thimble and transfer the extracted solids, as quantitatively as possible, onto cellulose filter paper in a Buchner funnel. Wash the solids with approximately 100 mL of fresh HPLC grade water. Allow the solids to dry using vacuum filtration or air dry.

Analyze the water extract for sucrose content if desired.

Once the water receiving flask has reached room temperature, transfer the water to a 200 mL volumetric flask. Bring to volume with HPLC grade water and mix well. Remove a 10.00 mL aliquot of the solution. Analyze the aliquot using a YSI analyzer equipped with appropriate membranes or equivalent sucrose quantification method. Replace the remaining 190.00 mL of water extract back into the water receiving flask. This removed volume must be compensated for during calculations.

#### **Analyze the sample for ethanol extractives**

Add  $190 \pm 5$  mL 190 proof ethyl alcohol to the tared ethanol receiving flask. Place the receiving flask on the Soxhlet apparatus. Adjust the heating mantles to provide a minimum of 6-10 siphon cycles per hour.

Reflux for 16-24 hours. The reflux time necessary will depend on the removal rate of components of interest, the temperature of the condensers, and the siphon rate.

When reflux time is complete, turn off the heating mantles and allow the glassware to cool to room temperature.

Remove the thimble and transfer the extracted solids, as quantitatively as possible, onto cellulose filter paper in a Buchner funnel. Wash the solids with approximately 100 mL of fresh 190 proof ethanol. Allow the solids to dry using vacuum filtration or air dry.

***Extract the sample- Automatic extraction method only***

**Prepare the apparatus for extraction .**

Dry the collection tubes, but not plastic lids or septa, in a  $105 \pm 5$  °C drying oven for a minimum of 12 hours. Remove the glassware and allow it to come to room temperature in a desiccator. Label each tube clearly and record the oven dry weight (ODW) to the nearest 0.1 mg.

Place two appropriately sized glass filters in the bottom of a labeled extraction cell, tamping down one at a time. A tamping rod is available to fit each extraction cell. Alternatively, a single polypropylene filter of appropriate size may be tamped into the bottom of the extraction cell. Polypropylene filter cloth may be used to cut filters, and is available from Sigma-Aldrich, catalog #Z557722,W 102 cm permeability factor activity 60 cfm. Polypropylene filters should not be used for incompatible solvents, such as hexane.

Add 1-10 g of sample to a tared extraction cell. Record the weight to the nearest 0.1 mg. The amount of sample necessary will depend on the bulk density of the biomass. Do not pack the biomass tightly in the thimble, as this can interfere with complete extraction. Do not use inert fillers to fill dead volume if further analysis of the biomass is required. Screw the ends of the cell on tightly. Place the cell in the automatic extractor, ensuring that the end with the filters is on the bottom.

**Analyze the sample for water extractives (if necessary) and ethanol extractives**

Create a method in the automatic extractor software. Using the Dionex ASE system, program the following parameters:

- Pressure: 1500 PSI
- Temperature: 100 oC
- Preheat time: 0
- Heat time: 5 minutes (automatic software default)
- Static time: 7 minutes
- Flush volume: 150%
- Purge time: 120 seconds (optional)
- Static cycles: 3



Note: If using 33 ml extraction cells, a flush volume of 150% and three static cycles may overflow the collection vial. Programming one static cycle per collection vial may be necessary.

Save one program for 100% water, if desired, and another for 100% 190 proof ethanol

Run each desired method on the sample. To avoid filling up the purge collection vials when running sequential water and ethanol extractions on a large number of samples, extract every sample with water, and then extract every sample with ethanol.

Allow the extraction cell to cool to room temperature. Remove the sample from the cell and allow the solids to air dry.

Analyze the water extract for sucrose content if desired.

Once the water collection tube has reached room temperature, transfer the water to a 50 mL volumetric flask. Bring to volume with HPLC grade water and mix well. Remove a 5.00 mL aliquot of the solution. Analyze the aliquot using a YSI analyzer equipped with appropriate membranes or equivalent sucrose quantification method. Replace the remaining 45.00 mL of water extract back into the water collection tube. This removed volume must be compensated for during calculations.

#### **Remove solvent from the extractives.**

Combine any solvent from the Soxhlet tube with the solvent in the receiver flask if using Soxhlet method. For automatic extraction method, remove collection vials from instrument.

The solvent may be removed from the extract using either apparatus listed or an equivalent device suitable for evaporating water and ethanol.

To remove the solvent using a rotary evaporator, use a rotary evaporator equipped with a water bath set to  $40 \pm 5$  °C and a vacuum source. Transfer the extract into a tared round bottom boiling flask. The vacuum source should be sufficient to remove solvent without extreme bumping. Continue to remove solvent until all visible solvent is gone.

To remove solvent using a TurboVapII, transfer the extract into a tared TurboVap tube if necessary, set the inlet pressure to 15 – 18 psi, and adjust the water bath to 40 °C. Continue to remove solvent until all visible solvent is gone.

Place the flask or tube in a vacuum oven at  $40 \pm 2$  °C for 24 hours. Cool to room temperature in a desiccator. Weigh the flask or tube and record the weight to the nearest 0.1 mg. If necessary, this step may also be performed on the bump trap to quantify any extract remaining in the bump trap.

## **11. Calculations**

Calculate the oven dry weight (ODW) of the sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass”.

$$ODW = \frac{(Weight_{thimble\ plus\ sample} - Weight_{thimble}) \times \%Total\ solids}{100}$$

Calculate the amount of extractives in the sample, on a percent dry weight basis. If sucrose measurements were performed, use the second equation to calculate extractives with a correction for the removed sample volume.

$$\% Extractives = \frac{(Weight_{flask\ plus\ extractives} - Weight_{flask})}{ODW_{sample}} \times 100$$

$$\% Extractives = \frac{(Weight_{flask\ plus\ extractives} - Weight_{flask})}{ODW_{sample}} \times \frac{290mL}{190mL} \times 100$$

To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation.

$$RPD = \left( \frac{(X_1 - X_2)}{X_{mean}} \right) \times 100$$

Where:

$X_1$  and  $X_2$  = measured values

$X_{mean}$  = the mean of  $X_1$  and  $X_2$

To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = mean = \sqrt{\left( \frac{\sum_1^n x}{n} \right)^2}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMS_{deviation} = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

$x_m$  = the root mean square of all x values in the set

$n$  = number of the samples in the set.

$x_i$  = a measured value from the set

## 12. Report Format

Report the average percent extractives in the sample on a dry weight basis. Standard deviation and relative percent difference may also be reported.

## 13. Precision and Bias.

Data obtained by replicate testing of a hybrid poplar sample in one laboratory, via Soxhlet, gave a standard deviation in extractive content of 0.15% and a CV% of 7.6%. Replicate testing of a National Institute of Standards and Technology (NIST) #8494 wheat straw gave a standard deviation of 0.20% and a CV% of 1.6% and NIST #8493 *Pinus radiata* gave a standard deviation of 0.20% and a CV% of 8.0%.

Prolonged heating of the extractive residue may bias the reported results low because of evaporation of semivolatile constituents. Insufficient heating or using inadequate vacuum can bias the results high due to incomplete removal of solvent.

## 14. Quality Control.

Reported Significant Figures: Report results as a weight percentage, with two decimal places. Standard deviation and relative percent difference may also be reported..

Replicates: Run all samples in duplicate.

Blank: Not applicable.

Relative percent difference criteria.

Calibration verification standard.

Sample size: The sample should be a minimum of three grams of sample per thimble, or the results should be flagged and the lack of precision noted.

Sample storage: If the extracted sample is greater than 90% solids, it may be stored at room temperature. If it is less than 90% solids, it should be stored in a refrigerator.

Standard storage: Not applicable.

Standard preparation: Not applicable.

Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The maximum size of a batch will be limited by equipment constraints.

Control charts: NIST standards or a QA/QC material should be control charted to verify reproducibility.

## 15. Appendices

None

## 16. References

ASTM Standard Test Method E 1690 "Determination of Ethanol Extractives in Biomass" in *2003 Annual book of ASTM Standards volume 11.05* Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

ASTM D1105-84, "Method for Preparation of Extractive-Free Wood." In *1993 Annual Book of ASTM Standards, Volume 04.09*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.

NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass."

TAPPI Test Method T204, "Solvent Extractives of Wood and Pulp." In *Tappi Test Methods*. Atlanta, GA: Technical Association of the Pulp and Paper Industry.

Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366.

# **ANEXO 3**



National Renewable Energy Laboratory

*Innovation for Our Energy Future*

# Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 4/25/2008

*Technical Report*  
NREL/TP-510-42618  
Revised April 2008

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C.  
Scarlata, J. Sluiter, and D. Crocker

NREL is operated by Midwest Research Institute • Battelle Contract No. DE-AC36-99-GO10337



# Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

*Technical Report*  
NREL/TP-510-42618  
Revised April 2008

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

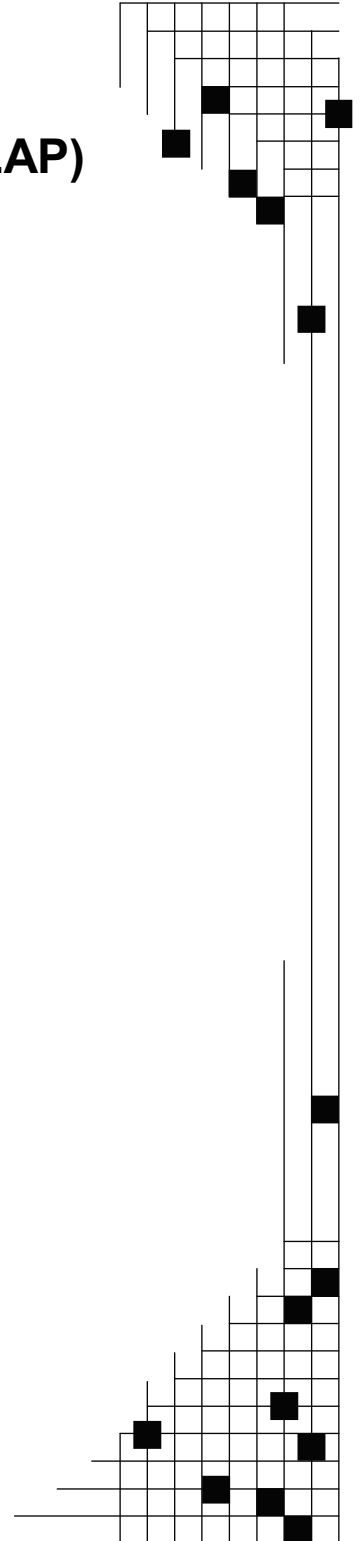
**Issue Date: 4/25/2008**

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata,  
J. Sluiter, and D. Crocker

**National Renewable Energy Laboratory**  
1617 Cole Boulevard, Golden, Colorado 80401-3393  
303-275-3000 • [www.nrel.gov](http://www.nrel.gov)

Operated for the U.S. Department of Energy  
Office of Energy Efficiency and Renewable Energy  
by Midwest Research Institute • Battelle

Contract No. DE-AC36-99-GO10337



## DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods ("Methods") are provided by the National Renewable Energy Laboratory ("NREL"), which is operated by the Midwest Research Institute ("MRI") for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.



# **Procedure Title: Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**

## **Laboratory Analytical Procedure**

### **1. Introduction**

Carbohydrates and lignin make up a major portion of biomass samples. These constituents must be measured as part of a comprehensive biomass analysis. Carbohydrates can be structural or non-structural. Structural carbohydrates are bound in the matrix of the biomass, while non-structural carbohydrates can be removed using extraction or washing steps. Lignin is a complex phenolic polymer.

Portions of this procedure are substantially similar to ASTM E1758-01 “Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC.

This procedure is suitable for samples that do not contain extractives. This procedure uses a two-step acid hydrolysis to fractionate the biomass into forms that are more easily quantified. The lignin fractionates into acid insoluble material and acid soluble material. The acid insoluble material may also include ash and protein, which must be accounted for during gravimetric analysis. The acid soluble lignin is measured by UV-Vis spectroscopy. During hydrolysis the polymeric carbohydrates are hydrolyzed into the monomeric forms, which are soluble in the hydrolysis liquid. They are then measured by HPLC. Protein may also partition into the liquid fraction. Acetate is measured by HPLC.

### **2. Scope**

This procedure is appropriate for extractives free biomass, which includes biomass that has been extracted using LAP “Determination of Extractives in Biomass”, as well as process solids containing no extractives. Results are reported on an oven dry weight basis. Results may be reported on an as received biomass basis or an extractives free basis, depending on type of biomass used. LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis” should be used prior to this procedure.

This procedure is appropriate for biomass containing the components listed throughout the procedure. Any biomass containing other interfering components not listed must be further investigated.

All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality Assurance Plan (QAP).

### **3. Terminology**

*Oven dry weight (ODW)*- the weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing.

*Prepared biomass*- biomass prepared according to LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”.

*Extractives free biomass* - Biomass after exhaustive water and ethanol extraction (refer to LAP “Determination of Extractives in Biomass”).

*Acid insoluble lignin*- the residue remaining on a medium porosity filtering crucible after a two step hydrolysis, with correction for acid insoluble ash and acid insoluble protein, if necessary.

*Structural carbohydrates*-Polymeric carbohydrates, namely cellulose and hemicellulose

*Non-structural components*- Non-chemically bound components of biomass that include but are not limited to sucrose, nitrate/nitrites, protein, ash, chlorophyll, and waxes

#### **4. Significance and Use**

This procedure is used, possibly in conjunction with other procedures, to determine the amount of structural carbohydrates and lignin in a solid biomass sample.

#### **5. Interferences**

This procedure has been optimized for the particle size range specified in LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”. Deviation to a smaller particle size may result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to excessive carbohydrate degradation. Deviation to a larger particle size may also result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars.

Samples containing extractives are not suitable for this procedure. Extractives will partition irreproducibly, resulting in a high lignin bias.

Samples with an ash content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the sample may contain soil or other minerals that will interfere with appropriate acid concentrations and may catalyze side reactions.

Samples with a moisture content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the excess moisture will interfere with appropriate acid concentrations. Samples should be dried (air-dried or oven dried at less than 40oC) prior to this procedure.

Samples containing protein will bias the acid insoluble lignin high unless the protein is accounted for in the gravimetric determination of acid insoluble material. An independent nitrogen analysis is required to estimate the protein content of the residue. The protein estimate is then subtracted from the acid insoluble residue measurement. Physical separation of the acid insoluble protein from the acid insoluble lignin is beyond the scope of this procedure.

This procedure is not suitable for samples containing added acid, base, or catalyst.

Certain guard columns for carbohydrate quantification may cause artifact peaks. Individual carbohydrates should be run on new columns and guard columns to verify to absence of artifact peaks.

## 6. Apparatus

Analytical balance, accurate to 0.1 mg.

Convection drying oven, with temperature control of  $105 \pm 3$  °C.

Muffle furnace, equipped with a thermostat, set to  $575 \pm 25$  °C or equipped with optional ramping program.

Water bath, set at  $30 \pm 3$  °C.

Autoclave, suitable for autoclaving liquids, set to  $121 \pm 3$  °C.

Filtration setup, equipped with a vacuum source and vacuum adaptors for crucibles.

Desiccator containing desiccant.

HPLC system equipped with refractive index detector and the following columns:

Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column (or equivalent) with ionic form H<sup>+</sup>/CO<sub>3</sub><sup>-</sup> deashing guard column.

Biorad Aminex HPX-87H column (or equivalent) equipped with an appropriate guard column

UV-Visible spectrophotometer, diode array or single wavelength, with high purity quartz cuvettes of pathlength 1 cm.

Automatic burette, capable of dispensing 84.00 mL water, optional

## 7. Reagents and materials

### Reagents

Sulfuric acid, 72% w/w (specific gravity 1.6338 at 20°C)- (also commercially available as a reagent for the determination of fluorine, from Fluka #00647).

Calcium carbonate, ACS reagent grade.

Water, purified, 0.2 µm filtered.

High purity standards : D-cellobiose, D(+)glucose, D(+)xylose, D(+)galactose, L(+)arabinose, and D(+)mannose

Second set of high purity standards, as listed above, from a different source (manufacturer or lot), to be used to prepare calibration verification standards (CVS)

### Materials

QA standard, well characterized, such as a National Institute of Standards and Technology (NIST) biomass standard or another well characterized sample of similar composition to the samples being analyzed

Pressure tubes, minimum 90 mL capacity, glass, with screw on Teflon caps and o-ring seals (Ace glass # 8648-30 tube with #5845-47 plug, or equivalent)

Teflon stir rods sized to fit in pressure tubes and approximately 5 cm longer than pressure tubes

Filtering crucibles, 25 mL, porcelain, medium porosity, Coors #60531 or equivalent

Bottles, wide mouth, 50 mL

Filtration flasks, 250 mL.

Erlenmeyer flasks, 50 mL.

Adjustable pipettors, covering ranges of 0.02 to 5.00 mL and 84.00 mL.

pH paper, range 4-9.

Disposable syringes, 3 mL, fitted with 0.2 µm syringe filters.

Autosampler vials with crimp top seals to fit

## **8. ES&H Considerations and Hazards**

Sulfuric acid is corrosive and should be handled with care..

Use caution when handling hot pressure tubes after removal from the autoclave, as the pressurized tubes can cause an explosion hazard.

When placing crucibles in a furnace or removing them, use appropriate personal protective equipment, including heat resistant gloves.

Operate all equipment in accordance with the manual and NREL Safe Operating Procedures 8.5 Follow all applicable NREL chemical handling procedures.

## **9. Sampling, Test Specimens and Test Units**

Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.

LAP "Preparation of Samples of Biomass Compositional Analysis" should be performed prior to this analysis. Samples must have a minimum total solids content of 85%

LAP "Determination of Extractives in Biomass" should be performed prior to this analysis if extractives are present in the sample.

LAP "Determination of Solids in Biomass" should be performed at the same time that samples for this analysis are weighed out.

This procedure is suitable for samples that have been air dried or lyophilized. Samples dried at a temperature of 45°C or higher are not suitable for this procedure.

Steps 9.2 to 9.4 should be applied to the QA standard

## **10. Procedure**

### **Prepare the sample for analysis and hydrolyze**

Place an appropriate number of filtering crucibles in the muffle furnace at 575 ±25 °C for a minimum of four hours. Remove the crucibles from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific period of time, one hour is recommended. Weigh the crucibles to the nearest 0.1 mg and record this weight. It is important to keep the crucibles in a specified order, if they are not marked with identifiers. Permanent marking decals are available from Wale Apparatus. Do not mark the bottom of the filtering crucible with a porcelain marker, as this will impede filtration.

Place the crucible back into the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than  $\pm 0.3$  mg change in the weight upon one hour of re- heating the crucible.

Weigh  $300.0 \pm 10.0$  mg of the sample or QA standard into a tared pressure tube. Record the weight to the nearest 0.1 mg. Label the pressure tube with a permanent marker. LAP “Determination of Total Solids in Biomass” should be performed at the same time, to accurately measure the percent solids for correction. Each sample should be analyzed in duplicate, at minimum. The recommended batch size is three to six samples and a QA standard, all run in duplicate.

Add  $3.00 \pm 0.01$  mL (or  $4.92 \pm 0.01$  g) of 72% sulfuric acid to each pressure tube. Use a Teflon stir rod to mix for one minute, or until the sample is thoroughly mixed.

Place the pressure tube in a water bath set at  $30 \pm 3$  °C and incubate the sample for  $60 \pm 5$  minutes. Using the stir rod, stir the sample every five to ten minutes without removing the sample from the bath. Stirring is essential to ensure even acid to particle contact and uniform hydrolysis.

Upon completion of the 60-minute hydrolysis, remove the tubes from the water bath. Dilute the acid to a 4% concentration by adding  $84.00 \pm 0.04$  mL deionized water using an automatic burette. Dilution can also be done by adding  $84.00 \pm 0.04$  g of purified water using a balance accurate to 0.01 g. Screw the Teflon caps on securely. Mix the sample by inverting the tube several times to eliminate phase separation between high and low concentration acid layers.

Prepare a set of sugar recovery standards (SRS) that will be taken through the remaining hydrolysis and used to correct for losses due to destruction of sugars during dilute acid hydrolysis. SRS should include D-(+)glucose, D-(+)xylose, D-(+)galactose, -L-(+)arabinose, and D-(+)mannose. SRS sugar concentrations should be chosen to most closely resemble the concentrations of sugars in the test sample. Weigh out the required amounts of each sugar, to the nearest 0.1 mg, and add 10.0 mL deionized water. Add 348  $\mu$ L of 72% sulfuric acid. Transfer the SRS to a pressure tube and cap tightly.

A fresh SRS is not required for every analysis. A large batch of sugar recovery standards may be produced, filtered through 0.2  $\mu$ m filters, dispensed in 10.0 mL aliquots into sealed containers, and labeled. They may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex the frozen SRS prior to use. If frozen SRS are used, the appropriate amount of acid must be added to the thawed sample and vortexed prior to transferring to a pressure tube.

Place the tubes in an autoclave safe rack, and place the rack in the autoclave. Autoclave the sealed samples and sugar recovery standards for one hour at 121°C, usually the liquids setting. After completion of the autoclave cycle, allow the hydrolyzates to slowly cool to near room temperature before removing the caps. (If step 10.2 is not performed, draw a 10 mL aliquot of the liquor for use in step 10.5.)

### **Analyze the sample for acid insoluble lignin as follows**

Vacuum filter the autoclaved hydrolysis solution through one of the previously weighed filtering crucibles. Capture the filtrate in a filtering flask.

Transfer an aliquot, approximately 50 mL, into a sample storage bottle. This sample will be used to determine acid soluble lignin as well as carbohydrates, and acetyl if necessary. Acid soluble lignin determination must be done within six hours of hydrolysis. If the hydrolysis liquor must be stored, it should be stored in a refrigerator for a maximum of two weeks. It is important to collect the liquor aliquot before proceeding to step 10.2.3.

Use deionized water to quantitatively transfer all remaining solids out of the pressure tube into the filtering crucible. Rinse the solids with a minimum of 50 mL fresh deionized water. Hot deionized water may be used in place of room temperature water to decrease the filtration time.

Dry the crucible and acid insoluble residue at  $105 \pm 3$  °C until a constant weight is achieved, usually a minimum of four hours.

Remove the samples from the oven and cool in a desiccator. Record the weight of the crucible and dry residue to the nearest 0.1 mg.

Place the crucibles and residue in the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C for  $24 \pm 6$  hours.

A furnace with temperature ramping may also be used

Furnace Temperature Ramp Program:

Ramp from room temperature to 105 °C

Hold at 105°C for 12 minutes

Ramp to 250 °C at 10°C / minute

Hold at 250 °C for 30 minutes

Ramp to 575 °C at 20 °C / minute

Hold at 575 °C for 180 minutes

Allow temperature to drop to 105 °C

Hold at 105 °C until samples are removed

Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific amount of time, equal to the initial cool time of the crucibles. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight. Place the crucibles back in the furnace and ash to a constant weight. (The amount of acid insoluble ash is not equal to the total amount of ash in the biomass sample. Refer to LAP "Determination of Ash in Biomass" if total ash is to be determined.)

### **Analyze the sample for acid soluble lignin as follows**

On a UV-Visible spectrophotometer, run a background of deionized water or 4% sulfuric acid.

Using the hydrolysis liquor aliquot obtained in step 10.2.2, measure the absorbance of the sample at an appropriate wavelength on a UV-Visible

spectrophotometer. Refer to section 11.3 for suggested wavelength values. Dilute the sample as necessary to bring the absorbance into the range of 0.7 – 1.0, recording the dilution. Deionized water or 4% sulfuric acid may be used to dilute the sample, but the same solvent should be used as a blank. Record the absorbance to three decimal places. Reproducibility should be  $\pm 0.05$  absorbance units. Analyze each sample in duplicate, at minimum. (This step must be done within six hours of hydrolysis.)

Calculate the amount of acid soluble lignin present using calculation 11.3.

### Analyze the sample for structural carbohydrates

Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified, referring to Table 1 for suggested concentration range. Use a four point calibration. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.

Table 1- Suggested concentration ranges for 10.4.1 calibration standards

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	0.1 – 4.0
D(+)glucose	0.1 – 4.0
D(+)xylose	0.1 – 4.0
D(+)galactose	0.1 – 4.0
L(+)arabinose	0.1 – 4.0
D(+)mannose	0.1 – 4.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (2.5 suggested)

A fresh set of standards is not required for every analysis. A large batch of standards may be produced, filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  filters into autosampler vials, sealed and labeled. The standards and CVS samples may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex frozen standards prior to use. During every use, standards and CVS samples should be observed for unusual concentration behavior. Unusual concentrations may mean that the samples are compromised or volatile components have been lost. Assuming sufficient volume, standards and CVS samples should not have more than 12 injections drawn from a single vial. In a chilled autosampler chamber, the lifetime of standards and CVS samples is approximately three to four days.

Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards. Use reagents from a source or lot other than that used in preparing the calibration standards. Prepare the CVS at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.

Using the hydrolysis liquor obtained in step 10.2.2, transfer an approximately 20 mL aliquot of each liquor to a 50 mL Erlenmeyer flask.

Use calcium carbonate to neutralize each sample to pH 5 – 6. Avoid neutralizing to a pH greater than 6 by monitoring with pH paper. Add the calcium carbonate slowly after reaching a pH of 4. Swirl the sample frequently. After reaching pH 5 – 6, stop calcium carbonate addition, allow the sample to settle, and decant off the supernatant. The pH of the liquid after settling will be approximately 7. (Samples should never be allowed to exceed a pH of 9, as this will result in a loss of sugars.)

Prepare the sample for HPLC analysis by passing the decanted liquid through a 0.2 µm filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. Prepare each sample in duplicate, reserving one of the duplicates for analysis later if necessary. If necessary, neutralized samples may be stored in the refrigerator for three or four days. After this time, the samples should be considered compromised due to potential microbial growth. After cold storage, check the samples for the presence of a precipitate. Samples containing a precipitate should be refiltered, while still cold, through a 0.2 µm filters.

Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column equipped with the appropriate guard column.

HPLC conditions:

Injection volume: 10 – 50 µL, dependent on concentration and detector limits  
Mobile phase: HPLC grade water, 0.2 µm filtered and degassed

Flow rate: 0.6 mL / minute

Column temperature: 80 - 85°C

Detector temperature: as close to column temperature as possible

Detector: refractive index

Run time: 35 minutes

Note: The deashing guard column should be placed outside of the heating unit and kept at ambient temperature. This will prevent artifact peaks in the chromatogram.

Check test sample chromatograms for presence of cellobiose and oligomeric sugars. Levels of cellobiose greater than 3 mg/mL indicate incomplete hydrolysis. Fresh samples should be hydrolyzed and analyzed.



Check test sample chromatograms for the presence of peaks eluting before cellobiose (retention time of 4-5 minutes using recommended conditions). These peaks may indicate high levels of sugar degradation products in the previous sample, which is indicative of over hydrolysis. All samples from batches showing evidence of over-hydrolysis should have fresh samples hydrolyzed and analyzed.

**Analyze the sample for acetyl content if necessary**

Prepare 0.005 M (0.01 N) sulfuric acid for use as a HPLC mobile phase. In a 2L volumetric flask, add 2.00 mL of standardized 10 N sulfuric acid and bring to volume with HPLC grade water. Filter through a 0.2 µm filter and degas before use. If 10N sulfuric acid is not available, concentrated sulfuric acid may also be used. 278 µl concentrated sulfuric acid brought to volume in a 1L volumetric flask with HPLC grade water will also produce 0.005 M sulfuric acid.

Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified. Acetic acid is recommended, formic acid and levulinic acid are optional. A range of 0.02 to 0.5 mg/mL is suggested. An evenly spaced four point calibration is suggested. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.

Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards, using components obtained from a source other than that used in preparing the calibration standards. The CVS must contain precisely known amounts of each compound contained in the calibration standards, at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.

Prepare the sample for HPLC analysis by passing a small aliquot of the liquor collected in step 10.2.2 through a 0.2 µm filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. If it is suspected that the sample concentrations may exceed the calibration range, dilute the samples as needed, recording the dilution. The concentrations should be corrected for dilution after running.

Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Biorad Aminex HPX-87H column equipped with the appropriate guard column.

HPLC conditions:

Sample volume: 50 µL

Mobile phase: 0.005 M sulfuric acid, 0.2 µm filtered and degassed

Flow rate: 0.6 mL / minute

Column temperature: 55 -65°C

Detector temperature: as close to column temperature as possible

Detector: refractive index

Run time: 50 minutes

## 11. Calculations

Calculate the oven dry weight (ODW) of the extractives free sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass”.

$$ODW = \frac{Weight_{air\ dry\ sample} \times \%Total\ solids}{100}$$

Calculate and record the weight percent acid insoluble residue (AIR) and acid insoluble lignin (AIL) on an extractives free basis

$$\%AIR = \frac{Weight_{crucible\ plus\ AIR} - Weight_{crucible}}{ODW_{sample}} \times 100$$

$$\%AIL = \frac{(Weight_{crucible\ plus\ AIR} - Weight_{crucible}) - (Weight_{crucible\ plus\ ash} - Weight_{crucible}) - Weight_{protein}}{ODW_{sample}} \times 100$$

where:

Weight<sub>protein</sub> = Amount of protein present in the acid insoluble residue, as determined in LAP “Determination of Protein Content in Biomass”. This measurement is only necessary for biomass containing high amounts of protein.

Calculate the amount of acid soluble lignin (ASL) on an extractives free basis.

$$\%ASL = \frac{UV_{abs} \times Volume_{filtrate} \times Dilution}{\epsilon \times ODW_{sample}} \times 100$$

where:

UV<sub>abs</sub> = average UV-Vis absorbance for the sample at 320 nm

Volume<sub>hydrolysis liquor</sub> = volume of filtrate, 87 mL.

$$Dilution = \frac{Volume_{sample} + Volume_{diluting\ solvent}}{Volume_{sample}}$$

$\epsilon$  = Absorptivity of biomass at specific wavelength (see table below)

Absorptivity constants for acid soluble lignin measurement for select biomass types

Biomass type	Lambda max (nm)	Absorptivity at lambda max (L/g cm)	Recommended wavelength (nm)	Absorptivity at recommended wavelength (L/g cm)
Pinus Radiata- NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover- NREL supplied feedstock	198	55	320	30
Populus deltoides- NIST SRM 8492	197	60	240	25

Note: Lambda max values often contain interfering peaks from carbohydrate degradation products. Recommended wavelength values have been chosen to minimize these interferences.

Calculate the total amount of lignin on an extractives free basis

$$\%Lignin_{ext\ free} = \%AIL + \%ASL$$

Calculate the total lignin value to an as received basis, if necessary.

$$\%Lignin_{as\ received} = (\%Lignin_{ext\ free}) \times \frac{(100 - \%Extractives)}{100}$$

where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP "Determination of Extractives in Biomass"

Create a calibration curve for each analyte to be quantified using linear regression. From these curves, determine the concentration in mg/mL of each component present in the samples analyzed by HPLC, correcting for dilution if required.

Calculate and record the amount of each calibration verification standard (CVS) recovered following HPLC analysis.

$$\%CVS_{recovery} = \frac{conc.\ detected\ by\ HPL,\ mg / mL}{known\ conc.\ of\ standard,\ mg / mL} \times 100$$

For the sugar recovery standards (SRS), calculate the amount of each component sugar recovered after dilute acid hydrolysis, accounting for any dilution made prior to HPLC analysis. Average any replicate (%R<sub>sugar</sub>) values obtained for each individual sugar and report %R<sub>avg, sugar</sub>.

$$\%R_{sugar} = \frac{\text{conc. detected by HPL, mg / mL}}{\text{known conc. before hydrolysis, mg / mL}} \times 100$$

Use the percent hydrolyzed sugar recovery values calculated in step 11.8 to correct the corresponding sugar concentration values obtained by HPLC for each of the hydrolyzed samples (C<sub>cor. sample</sub>), accounting for any dilution made prior to HPLC analysis.

$$C_x = \frac{C_{HPLC} \times \text{dilution factor}}{\%R_{ave. sugar} / 100}$$

Where: C<sub>HPLC</sub> = conc. of a sugar as determined by HPLC, mg/mL.

% R<sub>ave. sugar</sub> = average recovery of a specific SRS component.

C<sub>x</sub> = C<sub>cor. sample</sub>, concentration in mg/mL of a sugar in the hydrolyzed sample after correction for loss on 4% hydrolysis

Calculate the concentration of the polymeric sugars from the concentration of the corresponding monomeric sugars, using an anhydro correction of 0.88 (or 132/150) for C-5 sugars (xylose and arabinose) and a correction of 0.90 (or 162/180) for C-6 sugars (glucose, galactose, and mannose)

$$C_{anhydro} = C_{corr} \times \text{Anhydro correction}$$

Calculate the percentage of each sugar on an extractives free basis

$$\%Sugar_{ext\ free} = \frac{C_{anhydro} \times V_{filtrate} \times \frac{1}{1000mg}}{ODW_{sample}} \times 100$$

Where: V<sub>filtrate</sub> = volume of filtrate, 87.00 mL.

Calculate the percentage of each sugar on an as received basis, if necessary.

$$\%Sugar_{as\ received} = (\%Sugar_{ext\ free}) \times \frac{(100 - \%Extractives)}{100}$$

Where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP "Determination of Extractives in Biomass"

Calculate the acetate percentage on an extractives free basis.

$$\%Acetate_{ext\ free} = \frac{C_{AA,HPLC} \times Volume_{filtrate} \times Conversion\ factor}{ODW_{sample}} \times 100$$

where:

$C_{AA,HPLC}$  = concentration in mg/mL of acetic acid as determined by HPLC

$Volume_{hydrolysis\ liquor}$  = volume of filtrate, 87 mL

Conversion factor = 0.683, the conversion from acetic acid to acetate in biomass

Calculate the acetyl percentage on an as received basis, if necessary.

$$\%Acetyl_{as\ received} = (\%Acetyl_{ext\ free}) \times \frac{(100 - \%Extractives)}{100}$$

To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation

$$RPD = \left( \frac{(X_1 - X_2)}{X_{mean}} \right) \times 100$$

Where:

$X_1$  and  $X_2$  = measured values

$X_{mean}$  = the mean of  $X_1$  and  $X_2$

To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = mean = \sqrt{\left( \frac{\sum_1^n x}{n} \right)^2}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMS_{desviation} = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

$x_m$  = the root mean square of all x values in the set

$n$  = number of the samples in the set.

$x_i$  = a measured value from the set

## **12. Report Format**

Report the weight percent of lignin, each sugar, and acetate. Report on an as received basis, correcting for extractives if necessary

For replicate analyses, report the average and relative percent difference

## **13. Precision and Bias**

*Round robin testing* – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

## **14. Quality Control**

Reported Significant Figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.

Replicates: Run all samples in duplicate.

Blank: none.

Relative percent difference criteria: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.

Calibration verification standard: Calibration verification standards should be independently prepared and analyzed as appropriate, per the procedure.

Sample size: 4g, minimum, of sample, extracted if necessary (including amount necessary for percent solids determination).

Sample storage: Hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to two weeks. Neutralized hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to four days.

Standard storage: HPLC standards should be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex samples prior to use.

Standard preparation: Standards should be prepared as described in the procedure, including a QA standard.

Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The recommended size is three to six samples with a QA standard, all run in duplicate.

Control charts: All CVS, SRS recoveries, and NIST or QA standards should be control charted.

## **15. Appendices**

None

## **16. References**

NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Total Solids in Biomass".

NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Ash in Biomass".

- NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Extractives in Biomass".
- NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#002 "Determination of Structural Carbohydrate Content in Biomass by High Performance Liquid Chromatography".
- NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#003 "Determination of Acid Insoluble Lignin in Biomass".
- NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#017 "Determination of o-Acetyl Groups in Biomass by High Performance Liquid Chromatography".
- NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#019 "Hydrolysis of Corn Stover for Compositional Analysis".
- Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.
- ASTM E1758-01 "Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC: In *2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International
- Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366

# **ANEXO 4**





## Determination of Ash in Biomass

### Laboratory Analytical Procedure (LAP)

**Issue Date: 7/17/2005**

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata,  
J. Sluiter, and D. Templeton

**Technical Report**  
**NREL/TP-510-42622**  
**January 2008**

NREL is operated by Midwest Research Institute • Battelle Contract No. DE-AC36-99-GO10337



# Determination of Ash in Biomass

*Technical Report*  
NREL/TP-510-42622  
January 2008

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

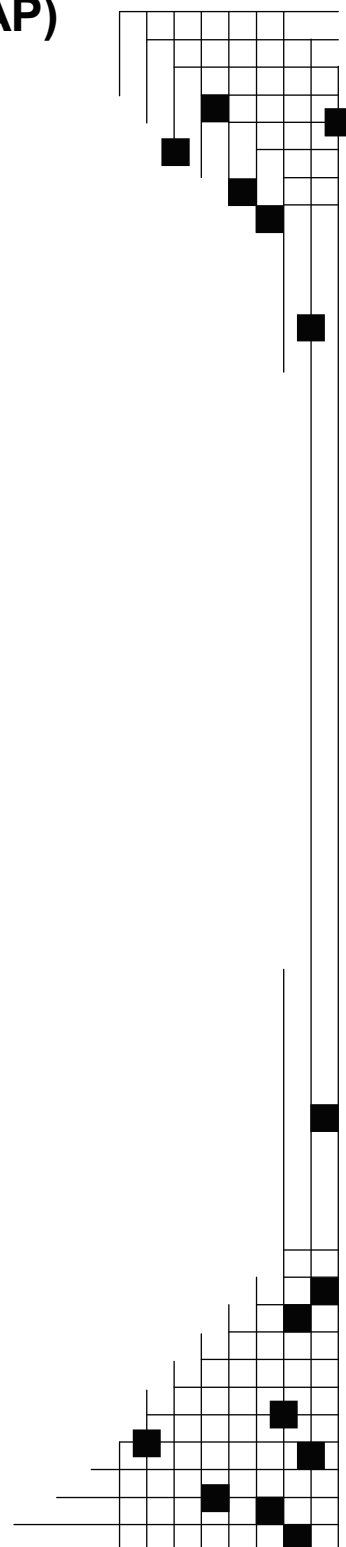
**Issue Date: 7/17/2005**

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata,  
J. Sluiter, and D. Templeton

**National Renewable Energy Laboratory**  
1617 Cole Boulevard, Golden, Colorado 80401-3393  
303-275-3000 • [www.nrel.gov](http://www.nrel.gov)

Operated for the U.S. Department of Energy  
Office of Energy Efficiency and Renewable Energy  
by Midwest Research Institute • Battelle

Contract No. DE-AC36-99-GO10337



## DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods ("Methods") are provided by the National Renewable Energy Laboratory ("NREL"), which is operated by the Midwest Research Institute ("MRI") for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

# **Procedure Title: Determination of Ash in Biomass**

## **Laboratory Analytical Procedure**

### **1. Introduction**

The amount of inorganic material in biomass, either structural or extractable, should be measured as part of the total composition. Structural ash is inorganic material that is bound in the physical structure of the biomass, while extractable ash is inorganic material that can be removed by washing or extracting the material. Extractable ash can be the result of soil remaining in the biomass. Refer to LAP "Total Mass Closure" for information on where to utilize this procedure.

This procedure is substantially similar to ASTM Standard Method Number E1755-01 "Standard Method for the Determination of Ash in Biomass".

This test method covers the determination of ash, expressed as the percentage of residue remaining after dry oxidation at 550 to 600oC. All results are reported relative to the 105oC oven dry weight of the sample.

### **2. Scope**

This procedure is applicable to hard and soft woods, herbaceous materials, agricultural residues, wastepaper, and solid fraction process samples.

All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality Assurance Plan (QAP).

### **3. Terminology**

*Oven dry weight (ODW)*- the weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing

*Prepared biomass*- biomass prepared according to LAP "Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis".

*Ash*- The inorganic residue left after dry oxidation at 575°C.

### **4. Significance and Use**

The ash content is a measure of the mineral content and other inorganic matter in biomass and is used in conjunction with other procedures to determine to total composition of biomass samples.

This procedure is used, in conjunction with other procedures to determine the chemical composition of biomass samples, see LAP "Summative Mass Closure for Biomass Samples".

### **5. Interferences**

None

## 6. Apparatus

Muffle furnace, equipped with a thermostat, set to  $575 \pm 25$  °C or equipped with optional ramping program.

Analytical balance, accurate to 0.1 mg.

Desiccator containing desiccant

Ashing crucibles, 50 mL, porcelain, silica, or platinum

Porcelain markers, high temperature, or equivalent crucible marking method

Ashing burner, ignition source, tongs, and clay triangle with stand.

Convection drying oven, with temperature control of  $105 \pm 3$  °C, optional

## 7. Reagents and materials

Reagents

None

Materials

None

## 8. ES&H Considerations and Hazards

Use appropriate safety measures when handling open flame.

When placing crucibles in a furnace or removing them, use appropriate personal protective equipment, including heat resistant gloves.

Follow all applicable NREL chemical handling procedures

## 9. Sampling, Test Specimens and Test Units

Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.

LAP "Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis" should be performed prior to this analysis

LAP "Determination of Solids in Biomass" should be performed at the same time that samples for ash analysis are weighed out. Alternately,  $105^{\circ}\text{C}$  oven dry biomass may be used, eliminating the need for total solids corrections.

## 10. Procedure

Using a porcelain marker, mark an appropriate number of crucibles with identifiers, and place them in the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C for a minimum of four hours. (Marking crucibles with a porcelain marker will permanently mark them, so a generic identifier is recommended.) Remove the crucibles from the furnace directly into a desiccator. If using a furnace set to  $575 \pm 25$  °C, cool for a specific period of time, one hour is recommended. Record the cool time. Weigh the crucibles to the nearest 0.1 mg and record this weight.

Place the sample back into the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C and dry to constant weight. Constant weight is defined as less than  $\pm 0.3$  mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible.

Weigh 0.5 to 2.0 g, to the nearest 0.1 mg, of a test specimen into the tared crucible. Record the sample weight. If the sample being analyzed is a

105°C dried test specimen, the sample should be stored in a desiccator until use. If air dry samples are used, LAP “Determination of Total Solids in Biomass” should be performed at the same time, to accurately measure the percent solids for correction. Each sample should be analyzed in duplicate, at minimum.

Ash the samples. *Use step 10.4.1 if using a muffle furnace set to  $575 \pm 25$  °C. Use step 10.4.2 if using a muffle furnace with a ramping program.*

Ash the samples using a muffle furnace set to  $575 \pm 25$  °C.

Using an ashing burner and clay triangle with stand, place the crucible over the flame until smoke appears. Immediately ignite the smoke and allow the sample to burn until no more smoke or flame appears. Allow the crucible to cool before placing it in the muffle furnace. Alternately, a furnace with a temperature ramping function may be used to avoid pre-ignition.

Place the crucibles in the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C for  $24 \pm 6$  hours. When handling the crucible, protect the sample from drafts to avoid mechanical loss of sample

Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific amount of time, equal to the initial cool time of the crucibles. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight.

Place the sample back into the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than  $\pm 0.3$  mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible. When allowing samples to cool in a desiccator, it is necessary to maintain the initial cool time

Ash the samples using a muffle furnace equipped with a ramping program

Furnace Temperature Ramp Program: Ramp from room temperature to 105 °C

Hold at 105°C for 12 minutes

Ramp to 250 °C at 10°C / minute

Hold at 250 °C for 30 minutes

Ramp to 575 °C at 20 °C / minute

Hold at 575 °C for 180 minutes

Allow temperature to drop to 105 °C

Hold at 105 °C until samples are removed.

10.4.2.1 Place the crucibles in the muffle furnace and begin the ramping program. When handling the crucible, protect the sample from drafts to avoid mechanical loss of sample.

10.4.2.2 Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight.

10.4.2.3 Place the sample back into the muffle furnace at  $575 \pm 25$ °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than  $\pm$

0.3 mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible

## 11. Calculations

If an air dry sample was used, calculate the oven dry weight (ODW) of the sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass”.

$$ODW = \frac{Weight_{air\ dry\ sample} \times \%Total\ solids}{100}$$

Calculate and record the percentage ash on an ODW basis.

$$\%Ash = \frac{Weight_{crucible\ plus\ ash} - Weight_{crucible}}{ODW_{sample}} \times 100$$

To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation

$$RPD = \left( \frac{(X_1 - X_2)}{X_{mean}} \right) \times 100$$

Where:

$X_1$  and  $X_2$  = measured values

$X_{mean}$  = the mean of  $X_1$  and  $X_2$

To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = mean = \sqrt{\left( \frac{\sum_1^n x}{n} \right)^2}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMS_{deviation} = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

$x_m$  = the root mean square of all x values in the set

$n$  = number of the samples in the set.

$x_i$  = a measured value from the set

## 12. Report Format

Report ash as a percentage of the ODW of the sample. Report the percent solids, if applicable. Standard deviation and relative percent difference may also be reported.

## 13. Precision and Bias

*Round robin testing* – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

## 14. Quality control

Reported Significant Figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.

Replicates: Run all samples and method verification standards, if applicable, in duplicate, at minimum.

Blank: An empty aluminum dish or crucible should be run through the analysis. The dish should be weighed empty, ashed, and reweighed. The difference in weight must be less than the equivalent of a 0.5% error.

Relative percent difference criteria: Each sample must reproduce ash content  $\pm 0.5$  wt %.

Method verification standard (MVS): A MVS, such as a QA/QC sample, should be run in duplicate with every batch.

Sample size: 1-4 grams. If there is insufficient sample, the result should be flagged and the lack of precision noted.

Sample storage: If applicable, oven dried samples should be stored in a desiccator until ready to use.

Standard storage: Not applicable.

Standard preparation: Not applicable.

Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The maximum size of a batch will be limited by equipment constraints.

Control charts: MVS or a QA/QC material should be control charted to verify reproducibility.

Others: Biomass can rapidly gain or lose moisture when in contact with air. During the weighing steps, minimize the amount of time the sample and crucibles are exposed to the air.

## 15. Appendices

None



## 16. References

- Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.
- NREL** CAT Task Laboratory Analytical Procedure #005 "Standard Method for Ash in Biomass".
- TAPPI Test Method T211, "Ash in Wood and Pulp." *In Tappi Test Methods*. Atlanta, GA: Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
- Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366.
- ASTM E1755-01 "Standard Method for the Determination of Ash in Biomass" *In 2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, Internacional

# **ANEXO 5**

## TOTAL DIETARY FIBER ASSAY KIT / KIT DE ENSAYO DE FIBRA DIETÉTICA

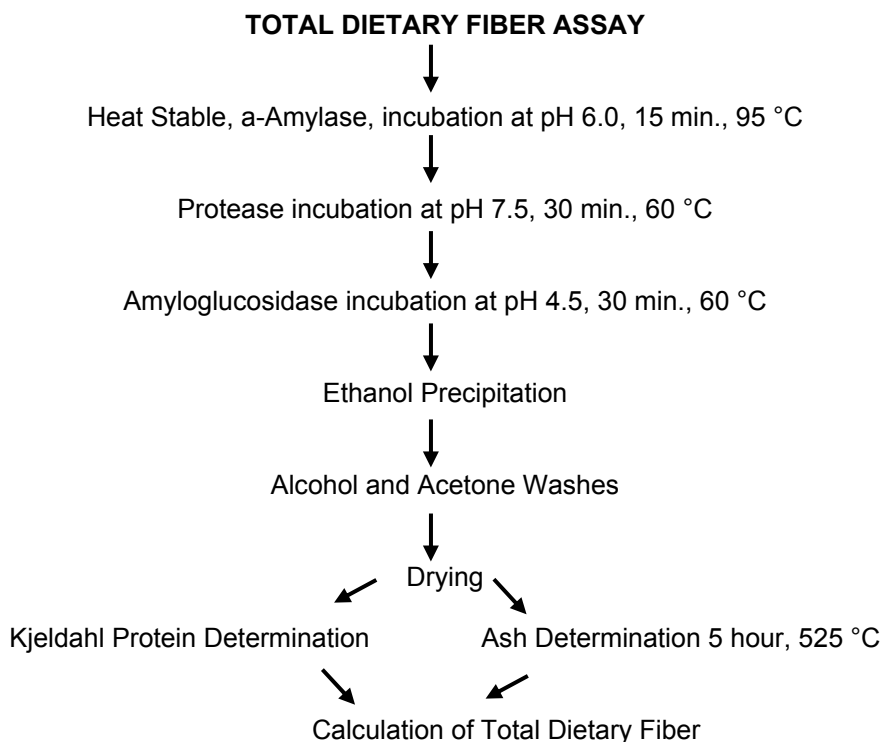
Código producto **DF-100A y TDF-C10**

### Introducción

La fibra dietética es una mezcla compleja de sustancias orgánicas e inicialmente se define como restos de células de plantas resistentes a la hidrólisis por la alimentación las enzimas de hombre.<sup>1</sup> Esta definición fue modificada para incluir las hemicelulosas, celulosas, ligninas, pectinas, gomas, oligosacáridos no digeribles, y ceras.<sup>2,3</sup> Esta definición más amplia reconoce la importancia de la fibra como componente de un producto químico y fisiológico de la dieta. Este procedimiento para la determinación de fibra dietética total se basa en el método publicado en la edición 16 de los métodos oficiales de análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC)<sup>4</sup>.

### Sumario del procedimiento

Este ensayo determina el contenido total de fibra dietética de los alimentos mediante una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras secas, y libres de grasa son gelatinizadas con  $\alpha$ -amilasa y luego digerido enzimáticamente con la proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón presente en la muestra. Se añade etanol a precipitar la fibra dietética soluble. El residuo se filtra y se lava con etanol y acetona. Después del secado, se pesa el residuo. La mitad de las muestras son analizadas para las proteínas y los otros son incinera. La fibra dietética total es el peso de los residuos, menos el peso de la proteína y cenizas.



Sigma-Aldrich Chemie GmbH · Industriestrasse 25 · Postfach · CH-9471 Buchs / Switzerland  
Tel. +41 / 81 755 25 11 · Fax +41 / 81 756 54 49 · [flukatec@sial.com](mailto:flukatec@sial.com)

**Reactivos contenidos:**

TDF-100A Kit – Total Dietary Fiber Assay Kit. Este kit contiene los suficientes reactivos para realizar 100 ensayos.

1.  $\alpha$ -Amylase, Estable al calor; Producto # A3306
2. Proteasa; Producto # P3910
3. Amyloglucosidasa; Producto # A9913
4. Celite™, lavada al ácido; Producto # C8656

TDF-C10 Kit – Total Dietary Fiber Assay Control Kit, Cada botella contiene suficiente cantidad para aproximadamente 10 ensayos.

1. Arabinogalactano; Producto # A9788
2. Caseína; Producto # C7906
3.  $\beta$ -Glucano; Producto # G7391
4. Pectina; Producto # P7536
5. Almidón, maíz; Producto # S2388
6. Almidón, trigo; Producto # S1514

**Reactivos requeridos y no incluidos;**

1. Éter de petróleo; Producto # 184519
2. Alcohol etílico, ACS; Producto # 459844
3. Acetona, ACS; Producto # 320110
4. Fosfato sódico bibásico anhídrido; producto # S0876
5. Fosfato sódico monobásico anhídrido; producto # S0751
6. Hidróxido sódico, 1.0 N; Producto # 93065
7. Ácido Hidroclórico, 1.0 M HCl; Producto # 9201

**Aparatos**

1. Crisol poroso porosidad # 2 (secundarios 40-60 micras)
2. Fuente de vacío. Una bomba de vacío o aspirador equipado con un frasco vacío de doble línea se debe usar para prevenir la contaminación en caso de copia de seguridad de agua.
3. Un horno de aire capaz de operar a 105 ° C, o un horno de vacío a 70 ° C
4. Horno de mufla
5. Horno de mufla.
6. Baño de agua en ebullición.
7. Baño de agua de temperatura regulable a 60 ° C ya sea con un agitador o multiestación agitador multiestación magnética para permitir la agitación de los matraces de digestión durante la hidrólisis enzimática.
8. Vasos de vidrio - 400 ml o 600 ml de forma alta
9. Balanza analítica capaz de pesar a 0,1 mg.
10. pH-metro - estandarizado a pH 4,0 y pH 7,0.

**Instrucciones de Preparación**Crisoles

Lavar a fondo crisoles. Calor una hora a 525 ° C y fresco. Remoje y enjuague crisoles en agua y luego secar al aire. Añadir 0,5 g de Celite a cada placa y seco a 130 ° C hasta peso constante (una hora o más). Enfriar en desecador y pesar con precisión de 0,1 mg. Registro esto como "Celite + Crisol de peso" o W1. Conservar en desecador hasta que se necesite.

Muestra

Sigma-Aldrich Chemie GmbH · Industriestrasse 25 · Postfach · CH-9471 Buchs / Switzerland  
Tel. +41 / 81 755 25 11 · Fax +41 / 81 756 54 49 · [flukatec@sial.com](mailto:flukatec@sial.com)

Si el contenido de materia grasa de la muestra es superior al 10%, desengrasar con éter de petróleo<sup>4</sup>. Registro de la pérdida de peso debido a la eliminación de grasa y efectuar las correcciones adecuadas a la Final % de fibra dietética. Cuando se trata de incógnitas, la grasa a extraer todas las muestras. Homogeneizar cada muestra, si es necesario, y secar toda la noche en un horno de aire a 105 ° C (70 ° C en vacío horno). Enfriar en desecador y muestra de molienda seca a 0.3-0.5 mm de malla. Si el aparato no está disponible para moler en un mortero será suficiente. Si la muestra no se puede calentar, congelar en seco antes de la molienda. Tienda de muestra seca en un desecador hasta el análisis se lleva a cabo.

#### Reactivos

de uso de agua destilada o desionizada para preparar las soluciones.

1. 78% etanol 207 ml de agua en litros un aforado de matraz. Diluir al volumen con etanol al 95%. Mezclar y llevar a volumen de nuevo con etanol al 95% si es necesario. Mix.
2. Buffer fosfato, 0,08 M, pH 6,0,  
disolver 1,4 g de Na 2HPO 4 (Código de producto S 0876) y 8,4 g de NaH2PO4 anhidro (Código de producto S 0751) en unos 700 ml de agua. Diluir a un litro con agua. Verificar el pH y ajustar si es necesario ya sea con NaOH o H3PO4. Almacene en contenedores herméticamente cerrados a temperatura ambiente.
3. Solución de hidróxido sódico, 0.275 N Diluir 275 ml de solución 1,0 N NaOH (Producto Código 930-65) en un litro con agua en un matraz aforado. Conservar en un recipiente bien tapado a temperatura ambiente.
4. Solución de ácido clorhídrico, 0.325 M Diluir 325 ml de solución 1,0 M de HCl (Código de producto 920-1) en un litro con agua en un matraz aforado. Conservar en un recipiente bien tapado a temperatura ambiente.

#### **Instrucciones de Preparación**

Determine el blanco junto con las muestras a través de todo el procedimiento para medir las contribuciones de los residuos de los reactivos. Las muestras y espacios en blanco para hacerse la prueba de contenido de fibra dietética se debe ejecutar al menos en cuatro de manera que la proteína duplicado y los valores de cenizas están disponibles para una mayor exactitud.

1. Pesar cuatro muestras de 1 gramo de cada material que se prueba en vasos de forma alta. Ponderaciones de la muestra no deben diferir en más de 20 mg. Registro de pesos a 0,1 mg.
2. Añadir 50 ml de tampón fosfato de pH 6,0 a cada vaso.
3. Añadir 0,10 ml a-amilasa (Código de producto A 3306) para cada vaso y mezclar bien.
4. Cubra cada vaso con una lámina de aluminio y colocarlo en un baño de agua hirviendo. Vasos de precipitado Agitar suavemente a intervalos de 5 minutos. Incubar durante 15 minutos después de que la temperatura interna de los vasos alcanza 95 ° C.
5. Permitir que las soluciones a enfriar a temperatura ambiente.
6. Ajustar el pH de las soluciones a  $7,5 \pm 0,2$  mediante la adición de 10 ml de NaOH 0,275 N a cada vaso. Verificar el pH, ajustar si es necesario ya sea con NaOH o HCl.
7. Inmediatamente antes de su uso, hacer una de 50 mg / ml de solución de la proteasa (P Código de producto 3910) en tampón fosfato. Pipeta de 0,1 ml (5 mg de proteasa) en cada vaso.

8. Cubra cada vaso con una lámina de aluminio y coloque en baño de agua a 60 ° C. Con agitación continua, incubar durante 30 minutos después de que la temperatura interna de los vasos llega a 60 ° C.
9. Permitir que las soluciones a enfriar a temperatura ambiente.
10. Ajustar el pH de las soluciones a un pH entre 4,0 y 4,6 mediante la adición de 10 ml de 0.325 M de HCl a cada vaso. Verificar el pH, ajustar si es necesario ya sea con NaOH o HCl.
11. Añadir 0,1 ml de amiloglucosidasa (Código de producto A 9913) a cada vaso.
  
12. Cubra cada vaso con una lámina de aluminio y coloque en baño de agua a 60 ° C. Con agitación continua, incubar durante 30 minutos después de que la temperatura interna de los vasos llega a 60 ° C.
13. Añadir 4 volúmenes de etanol de 95% a cada vaso.
14. Que las soluciones de toda la noche a temperatura ambiente para permitir que la precipitación total.
15. Filtración Húmedo y redistribuir la cama de Celite en cada crisol utilizando 78% de etanol. Aplicar succión suave para dibujar en Celite frita como incluso colchoneta. Mantener la succión suave y transferir cuantitativamente el precipitado y la suspensión de cada vaso a su crisol respectivos. Lavar el residuo con tres porciones de 20 ml de etanol de 78%, dos porciones de 10 ml de etanol de 95%, y dos porciones de 10 ml de acetona. Una de las encías pueden formar con algunas muestras, captura de líquido. Romper la película de la superficie con una espátula mejorará la tasa de filtración. Asegúrese de enjuagar cualquier material adherido a la espátula en el crisol. El tiempo para la filtración y lavado puede variar desde 0,1 hasta 6 horas al crisol, con un promedio de 0,5 horas por cada crisol.
16. Seco crisoles que contienen residuos de noche en un horno de 105 ° C el aire o el horno 70 ° C al vacío.
17. Enfriamiento todos los crisoles en un desecador, pesar con precisión de 0,1 mg y registrar este peso como "residuos Celite + + crisol de peso" o W2.
18. Analizar los residuos de las dos muestras y dos espacios en blanco para las proteínas mediante el análisis de nitrógeno Kjeldahl, tal como se especifica en el procedimiento AOAC. Uso 6,25 como el factor para convertir el amoníaco determinado en el análisis de proteínas, excepto cuando se conoce el contenido de nitrógeno en la muestra de la proteína.
19. Incinerar el residuo en el crisol de dos muestras y dos espacios en blanco durante 5 horas a 525 ° C. Enfriar en desecador, pesar con precisión de 0,1 mg y registrar este peso como "cenizas + + Celite crisol de peso" o W3

### **Ensayos sobre la eficacia de la enzima**

Las enzimas incluido en el Kit de TDF-100A han sido evaluadas utilizando las muestras de ensayo que figuran en el cuadro siguiente. La actividad enzimática completa y la ausencia de actividades contaminantes indeseables se indica mediante la obtención de la esperada recuperación de la fibra dietética en cada muestra de prueba. Es aconsejable incluir caseína (Código de producto C 7906) y / o almidón de maíz (Código de producto S 2388) en cada determinación como los controles internos. Aproximadamente cada seis meses después de las enzimas kit se han abierto, cada una de las muestras de ensayo que figuran a continuación debe ejecutarse a través de todo el ensayo para la fibra dietética total para asegurar que no ocurre degradación o contaminación de las enzimas.

Referenzprobe	Sigma Produkt Nr.	Aktivität	Gewicht der Probe	Erwartete Wiedergewinnung % Ballaststoff
Arabinogalactan	A9788	Hemicellulase*	0.1 g	95 - 100
Casein	C7906	Protease **	0.3 g	0 - 2
β-Glucan	G7391	β-Glucanase *	0.1 g	95 - 100
Pektin	P7536	Pectinase *	0.1 g	95 - 100
Stärke, <i>Mais</i>	S2388	Amylase **	1.0 g	0 - 2
Stärke, Weizen	S1514	Amyloglucosidase**	1.0 g	0 - 1
		Amylase **		
		Amyloglucosidase**		

\* Esta actividad no esta presente en el ensayo

\*\* Esta actividad esta presente en el ensayo

### Cálculos

Peso del residuo = W 2-W 1

Peso cenizas = W 3 -W1

B = R<sub>BLANK</sub> - P<sub>BLANK</sub> - A<sub>BLANK</sub>

% TDF =  $[R_{\text{SAMPLE}} - P_{\text{SAMPLE}} - A_{\text{SAMPLE}} - B) / SW] \times 100$

Donde :

TDF = Fibra dietética Total

R = Peso promedio de residuo (mg)

P = Peso promedio proteína (mg)

A = Peso promedio cenizas (mg)

SW = Peso promedio de muestra (mg)

### Referencias

1. Trowell, H., Lancet, **1**, 504 (1974).
2. Trowell, H., et.al., Lancet, **1**, 967 (1976).
3. Van Soest, P.J. and McQueen, R.W., Proc. Nutr. Soc., **32**, 123-130 (1973).
4. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume II, Section 45.4.07, Method 985.29 (1997).
5. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume I, Section, 12.1.07, Method 960.52 (1997).

CELITE® : eingetragene Warenmarke der Celite Corporatio

# **ANEXO 6**





# Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 3/31/2008

A. Suitler, B. Hames, D Hyman, C Payne,  
R. Ruiz, C. Scarlata, J. Suitler, D. Templeton,  
and J. Wolfe

*Technical Report*

NREL/TP-510-42621

Revised March 2008



*Technical Report*

**NREL/TP-510-42621**

**Revised March 2008**

# **Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples**

## **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**

**Issue Date: 3/31/2008**

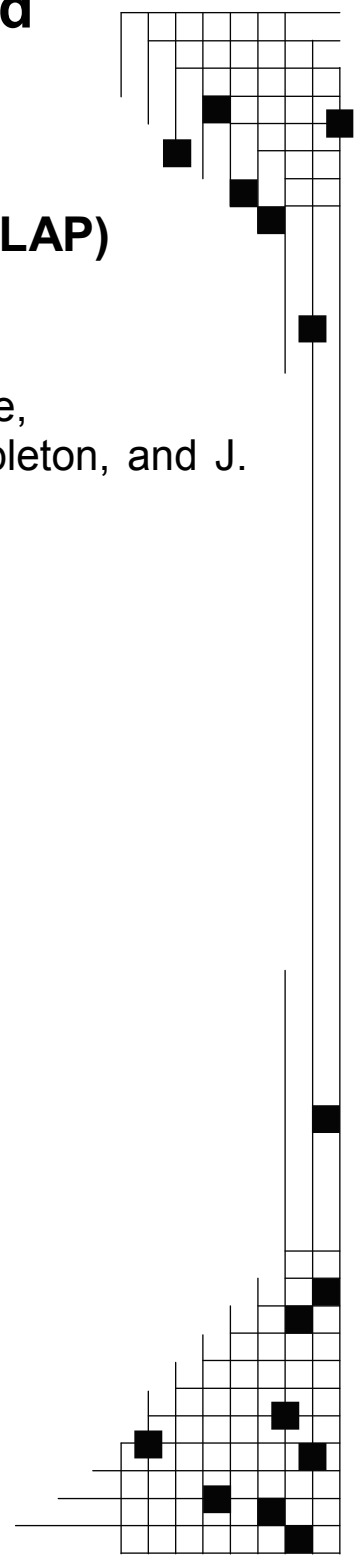
A. Sluiter, B. Hames, D. Hyman, C. Payne,  
R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and J.  
Wolfe

### **National Renewable Energy Laboratory**

1617 Cole Boulevard, Golden, Colorado 80401-3393  
303-275-3000 • [www.nrel.gov](http://www.nrel.gov)

Operated for the U.S. Department of Energy  
Office of Energy Efficiency and Renewable Energy  
by Midwest Research Institute • Battelle

Contract No. DE-AC36-99-GO10337



## DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods ("Methods") are provided by the National Renewable Energy Laboratory ("NREL"), which is operated by the Midwest Research Institute ("MRI") for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

**Procedure Title: Determination of Total Solids in  
Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process  
Samples  
Laboratory Analytical Procedure**

**1. Introduction**

Biomass samples can contain large and varying amounts of moisture, which can change quickly when exposed to air. To be meaningful, the results of chemical analyses of biomass are typically reported on a dry weight basis.

Portions of this procedure are similar to ASTM E1756-01 and T412 om-02. The following procedure describes the methods used to determine the amount of solids or moisture present in a solid or slurry biomass sample. It also covers the determination of dissolved solids in a liquor sample. A traditional convection oven drying procedure is covered as well as solids determination using an automatic infrared moisture analyzer. The convection oven method is recommended for liquor samples.

**2. Scope**

This procedure is intended to determine the amount of total solids remaining after 105°C drying of a biomass sample. All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality Assurance Plan (QAP).

**3. Terminology**

*Oven dry weight (ODW)*- the weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing.

*Total solids*- the amount of solids remaining after heating the sample at 105°C to constant weight. Conversely, the moisture content is a measure of the amount of water (and other components volatilized at 105°C) present in such a sample.

*Total dissolved solids*- the amount of residue remaining from a 0.2 µm filtered liquor sample after heating the sample at 105°C to constant weight.

*Prepared biomass*- biomass prepared according to LAP "Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis".

*Pretreated biomass*- biomass that has been chemically or thermally altered, possibly changing the structural composition.

*Slurry*- the combined liquid and solid material resulting from biomass pretreatment.

*Liquor*- the liquid fraction of a biomass slurry

#### 4. **Significance and Use**

The results of the chemical analyses of biomass samples are typically reported on a 105°C dry weight basis. The total solids content of a sample is used to convert the analytical results obtained on an as-received basis to that of an oven dry weight basis.

#### 5. **Interferences**

This procedure is not suitable for biomass samples that chemically change upon heating, such as acidic or alkaline biomass samples.

#### 6. **Apparatus**

Apparatus required for oven drying method:

Convection drying oven, with temperature control of  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Analytical balance, accurate to 0.1 mg.

Desiccator containing desiccant

Apparatus required for moisture analyzer method:

Automated infrared moisture analyzer.

Convection drying oven, with temperature control of  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , optional

#### 7. **Reagents and materials**

Reagents

None

Materials

Aluminum pans, made to fit infrared moisture analyzer if necessary.

Glass fiber pads for liquor samples, optional.

0.2  $\mu\text{m}$  pore size filters, either large syringe filters with syringes or 50 mm filter units, for liquor samples only

#### 8. **ES&H Considerations and Hazards**

Follow all applicable NREL chemical handling procedures.

This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.

#### 9. **Sampling, Test Specimens and Test Units**

Test specimens suitable for analysis by this procedure are as-received, air dried, milled, or extractive-free biomass solids and the solid fraction of process samples. Slurry and separated liquor samples are also suitable.

The test specimen size will be dependent on the type of material and shall be obtained in such a manner as to ensure that it is representative of the entire lot of material being tested.

This procedure is not suitable for biomass samples that chemically change upon heating, such as acidic or alkaline biomass samples.

## 10. Procedure

**Note:** Solid samples usually require 0.5 to 2 grams, slurry samples require 2-5 grams, and liquor samples require 10 ml, per duplicate. Liquor samples should be filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  pore size filter prior to analysis.

*Convection oven method is recommended for liquor samples.*

### **Convection oven method (use either 10.1 or 10.2)**

Pre-dry aluminum weighing dishes by placing them in a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  drying oven for a minimum of four hours. Cool the dishes in a desiccator. Using gloves or tweezers to handle the dishes, weigh a pre-dried dish to the nearest 0.1 mg. (It may be helpful to place a dry glass fiber pad in the bottom of each pan for liquor samples. Include the weight of the pad with the weight of the pan.) Record this weight.

Thoroughly mix the sample and then weigh out an appropriate amount to the nearest 0.1 mg, into the weighing dish. Liquor samples should be passed through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter prior to analysis. Record the weight of the sample plus weighing dish. Analyze each sample in duplicate, at minimum.

Place the sample into a convection oven at  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  for a minimum of four hours. Remove the sample from the oven and allow it to cool to room temperature in a desiccator. Weigh the dish containing the oven-dried sample to the nearest 0.1mg and record this weight.

Place the sample back into a convection oven at  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  and dry to constant weight. Constant weight is defined as  $\pm 0.1\%$  change in the weight percent solids upon one hour of re-heating the sample. Overnight drying is usually required for very wet or liquid samples.

### **Automatic infrared moisture analyzer method (use either 10.1 or 10.2)**

Program the automated moisture analyzer for a standby temperature of  $70^\circ\text{C}$ , an analysis temperature of  $105^\circ\text{C}$ , and an end point of less than 0.05% solids change in one minute.

Turn on the infrared heating elements and allow them to warm up for approximately 20 minutes. Run the instruments once with an unimportant, disposable sample to bring the heating elements to temperature, if necessary.

Pre-dry aluminum weighing dishes by placing them in a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  drying oven for a minimum of four hours or running them through the moisture analyzer once without a sample. If pans are dried in the oven, cool them in a desiccator. Using gloves or tweezers, place an aluminum weighing dish on the balance pan, and tare the balance if necessary.

Quickly transfer desired amount of the thoroughly mixed sample to the weighing dish. Spread the sample evenly over the surface of the weighing dish. Analyze each sample induplicate, at minimum.

As soon as the instrument balance stabilizes, shut the hood of the instrument and proceed with the analysis, following the instructions in the instrument operation manual.

Once the sample has been dried to constant weight, as determined by the programmed analysis parameters, the analysis will automatically be terminated. Record the percent solids or percent moisture.

## 11. Calculations

Calculate the percent total solids, or percent dissolved solids for a liquor sample, on a 105oC dry weight basis as follows (the automated moisture analyzer will provide the calculated value as part of the instrument printout).

$$\%Total\ solids = \frac{(Weight_{dry\ pan\ plus\ dry\ sample} - Weight_{dry\ pan})}{weight_{sample\ as\ received}} \times 100$$

$$\%Dissolved\ solids = \frac{(Weight_{dry\ pan\ plus\ dry\ liquor} - Weight_{dry\ pan})}{weight_{liquor\ as\ received}} \times 100$$

If desired, the percent moisture can also be calculated.

$$\%Moisture = 100 - \left( \frac{(Weight_{dry\ pan\ plus\ dry\ sample} - Weight_{dry\ pan})}{weight_{sample\ as\ received}} \times 100 \right)$$

To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation

$$RPD = \left( \frac{(X_1 - X_2)}{X_{mean}} \right) \times 100$$

Where:

$X_1$  and  $X_2$  = measured values  
 $X_{mean}$  = the mean of  $X_1$  and  $X_2$

To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = mean = \sqrt{\left(\frac{\sum_1^n x}{n}\right)^2}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMS_{deviation} = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

$x_m$  = the root mean square of all x values in the set

$n$  = number of the samples in the set.

$x_i$  = a measured value from the set

## 12. Report Format

Report the result as the percent total solids (or percent moisture), and cite the basis used in the calculations.

For replicate analyses of the same sample, report the average, standard deviation, and %RPD.

## 13. Precision and Bias

An inherent error in any moisture determination involving drying of the sample is that volatile substances other than water may be removed from the sample during dryin.

## 14. Quality Control

Reported Significant Figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan, see LAP "Rounding and Significant Figures".

Replicates: Run all samples and method verification standards, if applicable, in duplicate, at minimum.

Blank: This gravimetric analysis utilizes a balance blank with every batch of samples, consisting of a weighing dish passed through all steps of the procedure. The difference in weight must be less than the equivalent of a 0.5% error.



Relative percent difference criteria: Each sample must reproduce total solids content  $\pm 0.5$  wt %.

Method verification standard (MVS): A MVS may be run in duplicate with every batch. Sodium tartrate is a suitable material for use as a MVS, since the moisture content of this material is not greatly affected by its storage conditions. The published moisture loss on drying for sodium tartrate is 15.62% (84.38% total solids).

Sample size: Determined by sample matrix.

Sample storage: Samples should be stored in an airtight container. Process samples and high-moisture-content feedstock samples must be refrigerated or frozen until ready for use.

Standard storage: Not applicable.

Standard preparation: Not applicable.

Definition of a batch: Any number of samples analyzed and recorded together. The maximum size of a batch will be limited by equipment constraints.

Control charts: MVS or a QA/QC material should be control charted to verify reproducibility.

Others : Biomass can rapidly gain or lose moisture when in contact with air. During the weighing steps, minimize the amount of time the sample is exposed to the air.

## 15. Appendices

None

## 16. References

NREL Laboratory Analytical Procedure, "Determination of Moisture, Total Solids, and Total Dissolved Solids in Biomass Slurry and Liquid Process Samples."

NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure #001, "Standard Test Method for Determination of Total Solids in Corn Stover."

TAPPI Method T412 om-02. 2002. "Moisture in Pulp, Paper and Paperboard." Test methods of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry 2002-2003.

Vinzant, T.B., L. Ponfick, N.J. Nagle, C.I. Ehrman, J.B. Reynolds, and M.E. Himmel. 1994. "SSF Comparison of Selected Woods From Southern Sawmills." *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45/46:611-626.

Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.

Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366.