



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Magíster en Ciencias Forestales

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE HEMICELULOSAS DE
GENOTIPOS DE *Eucalyptus globulus* CONTRASTANTES EN DENSIDAD Y
RENDIMIENTO PULPABLE



PAULINA ALEJANDRA MARTINEZ BURGOS
CONCEPCIÓN-CHILE
2013

Profesor Guía: Regis Teixeira Mendonça
Dpto. de Manejo de Bosques y Medio Ambiente
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE HEMICELULOSAS DE GENOTIPOS DE *Eucalyptus globulus* CONTRASTANTES EN DENSIDAD Y RENDIMIENTO PULPABLE

Comisión Evaluadora:

Regis Teixeira Mendonça (Profesor guía)
Ingeniero Químico, Dr.

David Contreras (Comisión evaluación)
Bioquímico, Dr.

Miguel Pereira Soto (Comisión evaluación)
Ingeniero Civil Químico, Dr.



Director de Postgrado

Darcy Ríos
Bióloga, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales

Manuel Sánchez Olate
Ingeniero Forestal, Dr.



Dedicado a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a todos quienes han colaborado en la realización de esta investigación. A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Recursos Renovables del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, en especial a mi profesor guía Regis Teixeira Mendonça, y al Proyecto FONDECYT 1110828. También quisiera agradecer la colaboración de todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Productos Forestales del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Concepción, en especial al profesor Miguel Pereira.



INDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| INDICE GENERAL..... | v |
| INDICE DE FIGURAS | vii |
| INDICE DE TABLAS..... | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| ABSTRACT | xi |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Composición química de la madera..... | 3 |
| 1.1.1 Celulosa | 3 |
| 1.1.2 Hemicelulosas..... | 3 |
| 1.1.3 Lignina..... | 5 |
| 2 Pulpaje kraft | 6 |
| 2.1.1 Reacciones e importancia de los xilanos durante el pulpaje kraft..... | 7 |
| HIPÓTESIS | 12 |
| 3 OBJETIVOS..... | 13 |
| 3.1 Objetivo general..... | 13 |
| 3.2 Objetivos específicos | 13 |
| 4 METODOLOGÍA | 14 |
| 4.1 Genotipos de <i>Eucalyptus globulus</i> | 14 |
| 4.2 Preparación de holocelulosa | 14 |
| 4.3 Pulpaje kraft..... | 14 |
| 4.4 Aislación de Xilanos de holocelulosa y pulpa | 15 |
| 4.5 Análisis químicos..... | 15 |
| 4.5.1 Caracterización química | 15 |
| 4.5.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)..... | 17 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.5.3 | Espectroscopía ^1H -RMN..... | 17 |
| 4.6 | Análisis estadísticos..... | 17 |
| 5 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 18 |
| 5.1 | Caracterización química de madera y pulpa | 18 |
| 5.2 | Caracterización estructural de los xilanos aislados de madera y pulpa | 20 |
| 5.3 | Distribución de masas molares de los xilanos aislados | 26 |
| | CONCLUSIONES..... | 30 |
| | REFERENCIAS | 31 |



INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estructura parcial de la celulosa (Roger y Rowell 2005)..... | 3 |
| Figura 2: Estructura representativa del O-acetil-(4-O-metilglucorono) xilano (Johansson 2008).. | 4 |
| Figura 3: Estructura representativa del O-acetil-galactoglucomanano (Johansson 2008). | 4 |
| Figura 4: Estructuras precursores de la lignina; (I) alcohol cumarílico, (II) alcohol coniferílico y (III) alcohol sinapílico (Fengel y Wegener 1984). | 6 |
| Figura 5: Mecanismo de reacción de peeling en hemicelulosas de maderas duras durante el pulpaje kraft (Ek 2009)..... | 7 |
| Figura 6: Mecanismo de reacción hidrólisis alcalina en carbohidratos durante el pulpaje kraft (Ek 2009)..... | 8 |
| Figura 7: Formación HexA durante el proceso de pulpaje kraft (Ek 2009). | 8 |
| Figura 8: Formación LCC durante el pulpaje kraft (Sixta 2006). | 9 |
| Figura 9: Muestras de xilanos aislados desde holocelulosa y pulpa kraft. | 20 |
| Figura 10: Espectro ¹ H-RMN de la muestra de xilano aislado desde holocelulosa (A) y pulpa (B) del genotipo Eg1. | 22 |
| Figura 11: Numeración de los protones en una estructura representativa de xilano de <i>E. globulus</i> .22 | |
| Figura 12: Efecto de DS _{MeGlcA} en los xilanos de madera y pulpa (A y B) y DS _{HexA} en los xilanos de pulpa (C) sobre la retención de xilanos en pulpa. | 25 |
| Figura 13: Distribución de masa molar de los xilanos aislados desde holocelulosa (A) y pulpa (B) del genotipo Eg1. | 26 |
| Figura 14: Efecto de Mw sobre la retención de xilanos en pulpa..... | 28 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Composición química de la madera y pulpa de los genotipos de <i>E. globulus</i> | 19 |
| Tabla 2: Grado de sustitución (DS_{MeGlcA}) del MeGlcA y de los HexA (DS_{HexA}) por cada 10 unidades de xilosa en las muestras de xilanos aislados desde holocelulosa y de pulpa kraft de los genotipos de <i>E. globulus</i> | 24 |
| Tabla 3: Masa y numero de la masa molar promedio (M_w y M_n) y la polidispersidad (M_w/M_n) de los xilanos aislados de los genotipos de <i>E. globulus</i> | 27 |



RESUMEN

Genotipos de *Eucalyptus globulus* de 15 años de edad fueron seleccionados desde un grupo que presentaba diferencias en densidad básica (entre 573 a 471 kg/m³) y en rendimiento pulpable (entre 54,4 a 49,8%). Los genotipos fueron separados en 2 grupos de 3 arboles cada uno, grupo I: genotipos de alta densidad y alto rendimiento pulpable y grupo II: genotipos de baja densidad y bajo rendimiento pulpable. La madera y pulpa kraft de los genotipos seleccionados presentaron diferencias en su composición química. Estas diferencias estarían principalmente relacionadas con el contenido de celulosa, que es más alta en el grupo I (53,3-52,2%) y mas baja en el grupo II (49,2-48,5%) y de lignina, que es más baja en el grupo I (24,9-24,1%) y mas alta en el grupo II (26,9-25,8%). El contenido de xilanos también es más bajo en el grupo I (11,6-11,2%) y mas alto en el grupo II (14,3-12,6%) sin embargo, los xilanos del grupo I permanecen retenidos en mayor proporción en la pulpa (64-58,7%) que los xilanos de el grupo II (50,69-42,97%). Las hemicelulosas de *E. globulus*, principalmente xilanos, fueron aisladas desde holocelulosa de madera y desde pulpas kraft con el objetivo de determinar si presentaban diferencias en su composición química y estructural que pudieran estar relacionados con el rendimiento pulpable y la retención de xilanos en la pulpa. Los xilanos aislados desde holocelulosa y pulpa kraft de los genotipos seleccionados, presentaron diferencias en la composición química y estructural. Los xilanos aislados desde holocelulosa de los genotipos del grupo I presentaron valores mayores de DS_{MeGlcA} (1.4 - 1.9 MeGlcA/10 unidades de xilosa) en comparación a los genotipos del grupo II (0.9 - 1.3 MeGlcA/10 unidades de xilosa). Los xilanos aislados desde pulpa de los genotipos del grupos I también presentaron valores mayores de DS_{MeGlcA} (0.73-0.65 MeGlcA/10 unidades de xilosa) en comparación a los genotipos del grupor II (0.54-0.51 MeGlcA/10 unidades de xilosa), además, los xilanos aislados desde pulpa de los genotipos del grupos I presentaron valores mayores de DS_{HexA} (0.75-0.66 HexA/10 unidades de xilosa) en comparación a los genotipos del grupo II (0.58-0.52 HexA/10 unidades de xilosa). Los xilanos aislados desde holocelulosa del grupo I presentan valores de Mw entre 33,7-33,2 kDa mientras que para el grupo II los valores de Mw están entre 32,6 y 30,9 kDa . Los genotipos con mayor rendimiento pulpable y mayor retención de xilanos presentaron xilanos con una mayor masa molar y una mayor cantidad de sustituyentes ácidos metilglucurónicos en la madera, y una mayor cantidad de ácidos hexenurónicos en la pulpa. La retención de xilanos en la pulpa y el rendimiento pulpable estarían asociados a las características estructurales de los xilanos y no a la cantidad inicial de xilanos en

madera de acuerdo a los resultados obtenidos de la caracterización química y estructural de la madera, pulpa kraft y de los xilanos aislados de los genotipos seleccionados en este estudio.



ABSTRACT

Six *Eucalyptus globulus* genotypes with 15 years old were selected based on their differences in wood density and pulp yield. The genotypes were separated in 2 groups of 3 trees each: group I (samples Eg1, Eg2 and Eg3) presented wood density values of 547-573 kg/m³ and pulp yield of 52.7-54.6% and, group II (samples Eg4, Eg5 and Eg6) presented wood density of 471-485 kg/m³ and pulp yield of 49.8-52.3%. Wood and kraft pulp of genotypes selected showed differences in their chemical composition. Genotypes of group I presented high glucans (53,3-52,2%) as compared with genotypes from group II (49,2-48,5%) and low lignin content (24,9-24,1%) as compared with genotypes from group II (26,9-25,8%). Xylans content was slightly lower in genotypes of group I (11.2-11.6%) than in group II (12.6-14.3%). Kraft pulps of the genotypes of each group presented noticeable and significant differences in the retention of xylans (in relation with the original amount in wood), which was in the range of 54-59% for pulps of group I and 43-51% for pulps of group II. Xylans isolated from wood holocellulose and kraft pulp of genotypes of *E. globulus* showed differences in the structural characteristics. Xylans isolated from holocellulose in wood samples of group I presented high DS with MeGlcA (1.4 to 1.9 MeGlcA/10 xylose units) in comparison with xylans from group II (0.9 to 1.3 MeGlcA/10 xylose units). Xylans isolated from kraft pulp of group I presented high DS with MeGlcA (0.65 to 0.73 MeGlcA/10 xylose units) in comparison with xylans from group II (0.51 to 0.54 MeGlcA/10 xylose units). Xylans isolated from kraft pulp of group I presented high DS with HexA (0.65 to 0.75 HexA/10 xylose units) in comparison with xylans from group II (0.52 to 0.58 HexA/10 xylose units). Xylans isolated from holocellulose in wood samples of group I presented slightly high Mw (33.7-33.2 kDa) than xylans from group II (32.6 -30.9 kDa). The retention of xylans on pulp and pulp yield is associated to structural characteristics of the hemicelluloses. Xylans isolated from wood holocellulose and pulp with higher degree of substitution of the xylose residues with methylglucuronic acid (DSMeGlcA) provide a higher pulp yield and a higher retention of xylans on pulp

INTRODUCCIÓN

La madera es un material biológico complejo que se encuentra en los tallos y raíces de plantas y árboles. La madera es un recurso renovable y una materia prima versátil de la cual se puede obtener celulosa para papeles y cartones, derivados químicos, tableros y paneles, energía, madera para construcción, entre otros productos. La madera es producida por una zona de división celular, cerca de de la parte exterior del tronco, justo por debajo de la corteza, conocida como cambium vascular. El cambium es primordial para el continuo crecimiento del árbol. A medida que la copa del árbol aumenta con más ramas y hojas, aumenta la madera producida por el cambium, aumentando el grosor del tronco. En zonas de climas templados, la formación de madera es cíclica para cada primavera y verano, disminuyendo en cada otoño e invierno, dejando un patrón en la madera conocido como los anillos anuales de crecimiento. Los arboles que crecen en climas con inviernos menos intensos presentan anillos de crecimiento menos visibles que aquellos que crecen en climas con inviernos más severos (Butterfield 2006, Du y Groover 2010).

Para fines industriales, la madera se clasifica en dos grandes grupos: las maderas blandas o coníferas (como el pino, abeto y picea) y las maderas duras o latifoliadas (como el abedul, álamo, eucalipto, acacia y roble). Las maderas blandas tienen una estructura relativamente simple compuesta por hasta un 90% de células llamadas traqueidas, que son la base de apoyo estructural y de transporte de agua. Además de las traqueidas, están los canales resiníferos, las células de radio. Algunas maderas blandas presentan células de crecimiento axial, llamadas células del parénquima. Las maderas duras tienen una estructura mucho más compleja que la de maderas blandas, poseen células fibrilares alargadas como soporte, en proporción al diámetro. Estas células difieren de las células traqueidas de madera blanda, ya que son relativamente más cortas, con contornos transversales mas redondeados y sin ningún rol en el transporte ascendente de savia en el árbol. Las células encargadas del transporte de agua a lo largo del árbol son los elementos de los vasos. La maderas duras también poseen un sistema vertical de células del parénquima y un sistema horizontal de células del rayo parenquimatico. Las fibras de madera dura son más cortas y delgadas, lo que deriva en productos de papel con superficies suaves para impresión y de una alta opacidad. La densidad de maderas duras está determinada en gran medida por la proporción de fibra en relación a los otros elementos anatómicos. En maderas con baja densidad, los vasos ocupan una gran proporción de volumen de madera, mientras que maderas más densas tienen una mayor proporción de fibras de pared gruesa (Butterfield 2006).

Las fibras de madera son la principal materia prima para la producción de productos de papel. Los eucaliptos se encuentran entre las principales especies utilizados en la industria de la celulosa y papel. Existen más de 700 especies de eucalipto, pero solo tres son ampliamente utilizadas para la producción de celulosa: *E. grandis*, *E. globulus* y *E. nitens*. Una creciente importancia económica como materia prima para la producción de pulpa y papel ha adquirido *E. globulus* en países como Australia, Chile, Portugal y España (Himell 2002, Ramírez *et al.* 2009). En Chile, *E. globulus* comenzó a ser utilizado como fuente de fibra corta desde hace 25 años aproximadamente, y actualmente es ampliamente utilizado en la producción de pulpa debido a su rápido crecimiento y alto rendimiento de pulpa. La superficie total de esta especie en el país alcanza cerca de un 15% de la superficie forestal comercial con una productividad media de 35 m³/ha/año y una producción de pulpa de 2.000.000 de ton/año, equivalente al 40 % de la pulpa química producida en el país (INFOR 2010).

La industria forestal local ha desarrollado una intensa investigación para seleccionar los mejores genotipos para la producción de celulosa con el objetivo de incrementar el volumen de madera y pulpa producida por hectárea. Generalmente, el valor económico de madera para pulpa está determinado por el volumen del tronco y por la calidad de la pulpa producida. Históricamente, los programas de mejoramiento genético se basaron en el crecimiento y forma del árbol, sin considerar las propiedades de la madera. Se ha demostrado que las propiedades físicas y químicas de la madera también influyen en el rendimiento de la pulpa y calidad del papel (Clarke *et al.* 2008, Sixta 2006, Ramírez *et al.* 2009, Köhnke 2010, Elissetche *et al.* 2011). La incorporación de estas características en los programas de mejoramiento se está convirtiendo en una prioridad, debido a que propiedades pulpables también dependen de la cantidad, estructura y reactividad de las macromoléculas de la madera. Una breve revisión sobre los componentes de la madera y su efecto en la producción de celulosa kraft, con énfasis en los xilanos (principal hemicelulosa de latifoliadas) se describe a continuación para fundamentar la investigación realizada.

1.1 Composición química de la madera

1.1.1 Celulosa

La unidad básica del polímero de celulosa es la celobiosa, ya que la unidad que se repite en la celulosa es una unidad de dos azúcares (Figura 1). El número de unidades de glucosa en una molécula de celulosa se le conoce como el grado de polimerización (DP), El grado de polimerización de la celulosa de maderas nativas son en promedio de 9.000 a 10.000 (Sjöström 1993, Roger y Rowell 2005).

Las cadenas de celulosa están unidas entre sí por puentes de hidrogeno y débiles fuerzas de van der Waals, formando las unidades elementales o microfibrilas y la unión de microfibrilas forman las macrofibrilas. Estas fibras están cubiertas por hemicelulosa y lignina (Sjöström 1993, Roger y Rowell 2005, Mohammad *et al.* 2008).

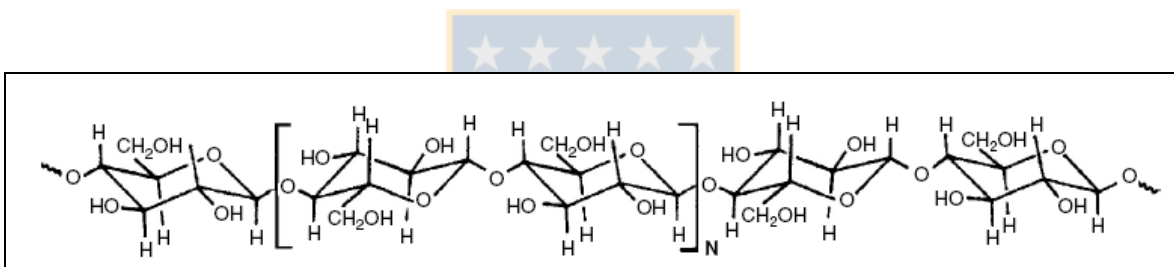


Figura 1: Estructura parcial de la celulosa (Roger y Rowell 2005).

1.1.2 Hemicelulosas

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos, su función en la pared celular es servir de puente de unión entre la celulosa y la lignina. La mayoría de las hemicelulosas tienen un grado de polimerización de 200. Las hemicelulosas se encuentran presentes en una proporción de entre 20 a 30% en peso seco de madera (Sjöström 1993). Por lo general, las hemicelulosas contienen una columna vertebral que consiste en unidades de monoméricas unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) glucosídicos, con puntos de ramificación (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), y/o (1 \rightarrow 6). La estructura y abundancia de las hemicelulosas varía ampliamente entre las diferentes especies de plantas. Desde el punto de vista biológico, el rol de las hemicelulosas es su contribución al fortalecimiento de la pared celular, por su interacción con la celulosa y la lignina, reforzando las

microfibrilas de la celulosa por entrecruzamiento formando una compleja red (Perrin *et al.* 1999, Scheller y Ulvskov 2010).

Las hemicelulosas de maderas latifoliadas son en su mayoría compuesto por heteroxilanos altamente acetilados, generalmente clasificados como O-metil-glucuronoxilanos (Figura 2). También se encuentran presentes hexosas como glucomananos, pero en pequeñas cantidades. Por el contrario, las maderas coníferas tienen una mayor proporción de hexosas como glucomananos acetilados y galactoglucomananos (Figura 3), y una menor proporción de xilanos (Sjöström 1993, Pereira 2003).

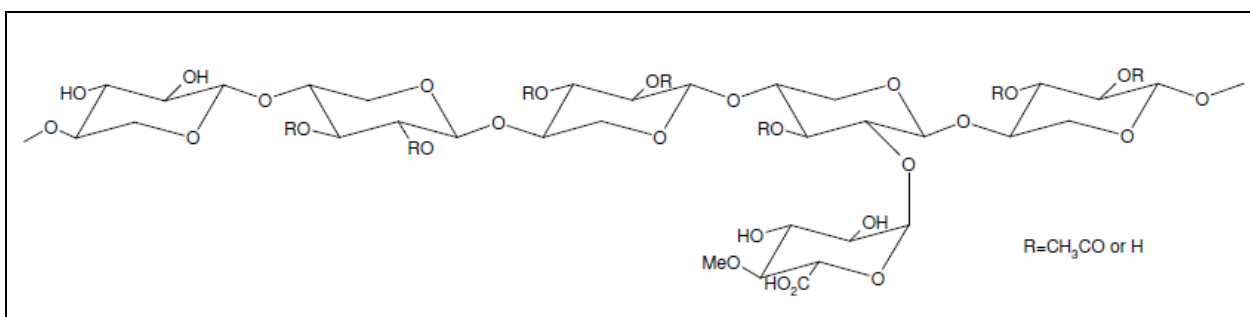


Figura 2: Estructura representativa del O-acetil-(4-O-metilglucorono) xilano (Johansson 2008).

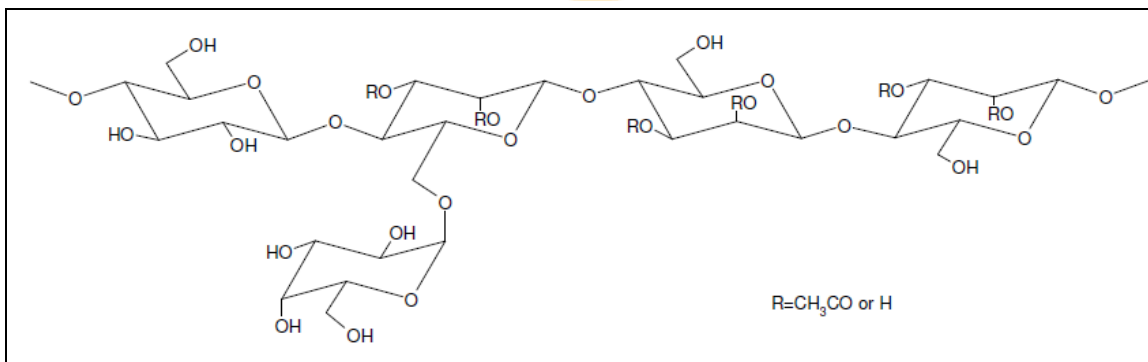


Figura 3: Estructura representativa del O-acetil-galactoglucomanano (Johansson 2008).

La principal hemicelulosa de madera dura es el O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilano también llamado glucuronoxilano, aunque por lo general a este tipo de hemicelulosas simplemente se les denomina como xilanos. Dependiendo de la especie, el contenido de xilanos varía entre un 15-30% en peso de madera seca. La columna vertebral se compone de β -D-unidades xilopiranosas, unidas por enlaces (1 \rightarrow 4). La mayoría de los residuos de xilosa contienen un grupo O-acetil en C-2 o C-3. Las unidades de xilosa en la cadena de xilanos además pueden llevar unidades de 4-O-metil- α -D-glucurónico unidos por enlaces (1 \rightarrow 2) de uno por cada diez residuos de xilosa. Los enlaces xilosídicos son fácilmente hidrolizados por los ácidos, mientras que las uniones entre los grupos de ácidos urónicos y xilosa son muy resistentes. Además de xilano, las maderas del tipo latifoliadas contienen 2-5% de glucomananos, que están compuestos de unidades β -D-glucopiranososa y β -D-manopiranososa, unidas por enlaces (1 \rightarrow 4). La proporción de manosas en la glucosa presente varía entre 1:2 y 1:1 (Sjöström 1993).

1.1.3 Lignina

La lignina es una macromolécula de estructura irregular, tridimensional, y de carácter hidrófobo, sintetizada a partir de 4-hidroxifenilpropanol (alcohol cumarílico, conilífero y sinapílico) que están conectados con numerosos tipos de enlaces. En la lignina las unidades p-hidroxifenilo derivan del alcohol p-cumarílico, las unidades de guaiacilo y siringilo derivan del alcohol coniferílico y sinapílico, respectivamente (Figura 4). En arboles de madera dura, la lignina se compone de unidades de siringilo y guaiacilo, mientras que en maderas de coníferas, se compone principalmente de unidades de guaiacilo. Los enlaces intermonolignoles más comunes son del tipo carbono-carbono y aril-eter. La principal función de la lignina en la madera es la de mantener unidas a las fibras, darle rigidez y protegerlas del ataque químico y físico. La estructura de la lignina se cree que varía entre las capas de la pared celular y entre regiones separadas morfológicamente en el árbol. En general para maderas duras, la lamela media y otras capas de la pared celular, contienen más unidades de guayacil que la pared celular secundaria (Fengel y Wegener 1984).

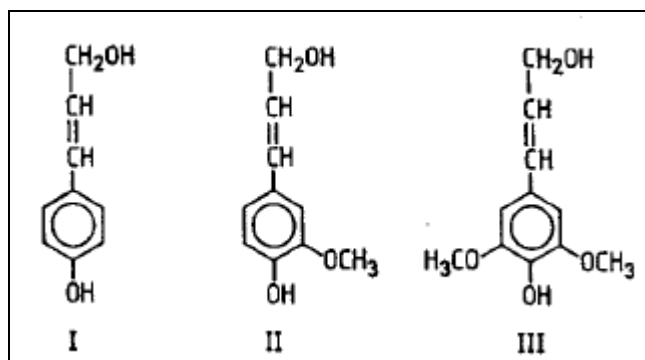


Figura 4: Estructuras precursores de la lignina; (I) alcohol cumarílico, (II) alcohol coniferílico y (III) alcohol sinapílico (Fengel y Wegener 1984).

2 Pulpaje kraft

En general, el proceso de pulpaje puede definirse como la eliminación de lignina de la madera para la liberación de las fibras de celulosa con el menor daño posible. Idealmente esto se lograría removiendo solo la lignina desde la pared celular. Sin embargo, los procesos de pulpaje como el pulpaje kraft, remueven porciones significativas de otros componentes, principalmente hemicelulosa junto con la lignina (Santiago y Pascoal Neto 2008).

Los principales agentes químicos activos en el proceso kraft son los aniones de hidroxilo e hidrosulfuro presentes en el licor de cocción, que consiste en una solución acuosa de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio, denominado licor blanco. El hidrosulfuro acelera y otorga selectividad al proceso de deslignificación. La deslignificación se puede dividir en tres partes: fase inicial, principal o bulk y fase final o residual. En la fase inicial, la deslignificación es causada por la ruptura de los enlaces α -aril y β -aril-eter en las unidades fenólicas de la lignina. En la fase bulk, la mayor parte de la lignina es removida con pérdidas menores de hidratos de carbono. La división de los enlaces β -aril-eter en las unidades no fenólicas de la lignina supone la principal reacción de deslignificación. En la fase final o residual del proceso de deslignificación, solo entre un 10 a 15% de la lignina nativa es removida. Sin embargo, como la deslignificación continua, la disolución de hidratos de carbono aumenta. A fin de mantener un alto rendimiento y para garantizar una calidad alta de pulpa, el proceso de deslignificación se limita hasta cierto contenido de remoción de lignina, orientado a números kappa de entre 25-30 para pulpa de maderas blandas y de 15-20 para pulpas de maderas duras (Sixta 2006).

2.1.1 Reacciones e importancia de los xilanos durante el pulpaje kraft

La pérdida de hidratos de carbono en la fabricación de pulpa kraft se debe al hecho de que la mayoría de los componentes de las hemicelulosas se degradan y disuelven en la solución alcalina. Sin embargo, glucomananos y xilanos se comportan de manera diferente. Los glucomananos se disuelven rápidamente independiente de la carga de álcali, mientras que la disolución de xilanos, ya sea en maderas blandas o maderas duras, se incrementa a una carga más alta de álcali. La reactividad de los carbohidratos durante el pulpaje kraft depende en gran medida de las características estructurales, como estructura y grado de polimerización (DP) (Sixta 2006). Las reacciones de los carbohidratos durante el pulpaje producen una gran pérdida de rendimiento, que comienza desde el inicio de la cocción. Consisten inicialmente en una depolimerización sucesiva de los polisacáridos a partir de un grupo externo reductor, reacción de peeling, a temperaturas cercanas a los 100°C (Figura 5). A temperaturas cercanas a los 170°C, ocurren las reacciones de hidrólisis alcalina, donde son hidrolizados los enlaces glucosídicos y los polisacáridos son fraccionados (Figura 6). En xilanos, la reacción de peeling es mucho menos eficiente debido a los sustituyentes, arabinosa y ácido O-metilglucoronico en maderas blandas y ácido 4-O-metilglucoronico en madera duras. La presencia de sustituyentes en la posición 3 estabiliza la cadena del polisacárido y evita que se produzca la reacción de peeling (Ek 2009).

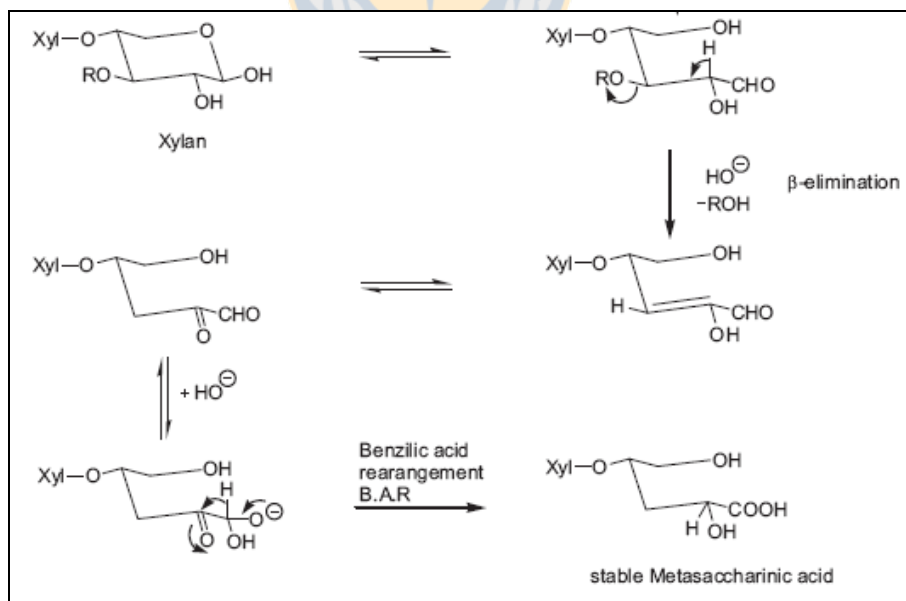


Figura 5: Mecanismo de reacción de peeling en hemicelulosas de maderas duras durante el pulpaje kraft (Ek 2009).

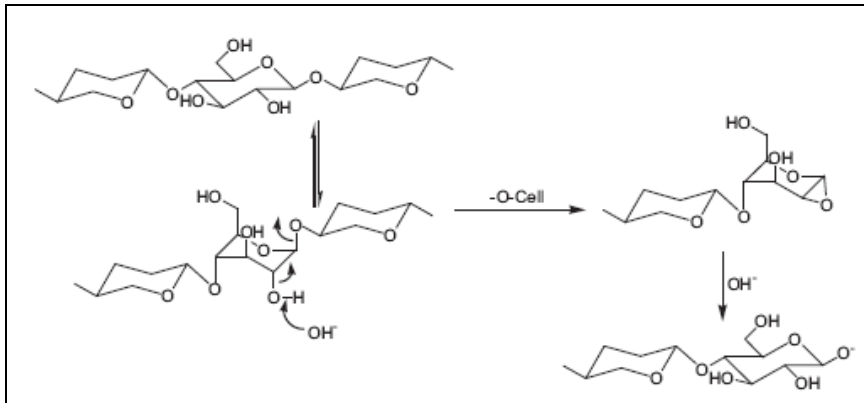


Figura 6: Mecanismo de reacción hidrólisis alcalina en carbohidratos durante el pulpaje kraft (Ek 2009).

En maderas blandas y duras, la cadena de xilano esta sustituida por el ácido 4-O-metilglucoronico, ubicado en la posición C-2 y unido a la cadena a través de enlaces α -glucosidicos. En condiciones alcalinas, el grupo metoxilo es eliminado como metanol, formándose el ácido hexenurónico (HexA). La eliminación de metanol y la formación de ácidos hexenurónicos ocurrirán rápidamente durante la fabricación de pulpa kraft (Figura 7). El xilano que queda en la pulpa después de la cocción contiene cantidades importantes de HexA. Estos influyen en la determinación del numero kappa y en la blanqueabilidad de la pulpa (Ek 2009).

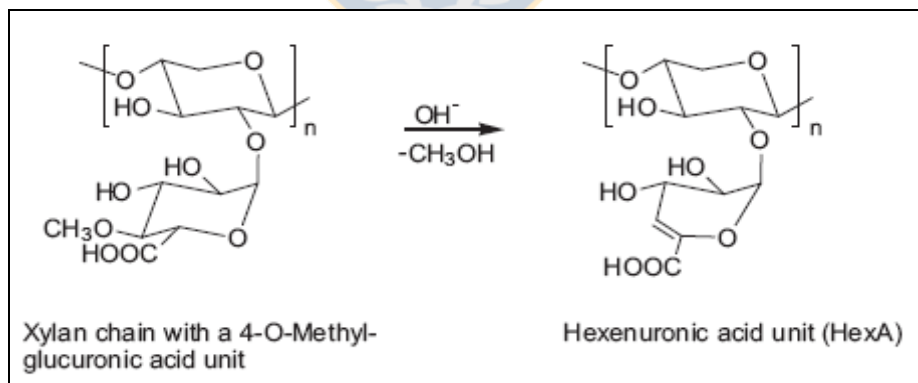


Figura 7: Formación HexA durante el proceso de pulpaje kraft (Ek 2009).

Durante la etapa bulk en el proceso de pulpaje, la fragmentación de unidades no fenólicas de lignina puede dar como resultado la formación de complejos lignina carbohidrato (LCC). De acuerdo al esquema presentado en la figura 8 el grupo hidroxilo de algún fragmento de carbohidrato puede atacar al átomo de carbono en la posición α , lo que resulta en la apertura del

anillo de oxirano y la formación de un enlaces ester entre la lignina y el fragmento de carbohidrato. Estos enlaces son considerados del tipo álcali resistente entre las unidades de lignina, lo que trae como consecuencia una eliminación incompleta (Sixta 2006).

Se ha demostrado que existe una relación entre las características estructurales de las hemicelulosas en la madera y rendimiento pulpable. Estudios realizados con diferentes especies de latifoliadas mostraron que a una mayor retención de xilanos en la pulpa, mayor es el rendimiento pulpable (Jacobs *et al.* 2001, Pinto *et al.* 2005, Magaton *et al.* 2011, Magaton *et al.* 2013). La retención de xilanos estaría asociada a las características estructurales de los xilanos y a la formación del complejo lignina-carbohidrato (LCC, figura 8), durante el proceso de pulpaje (Jacobs *et al.* 2001, Pinto *et al.* 2005, Sixta 2006, Danielsson 2007, Johansson 2008, Köhnke 2010, Magaton *et al.* 2011, Magaton *et al.* 2013).

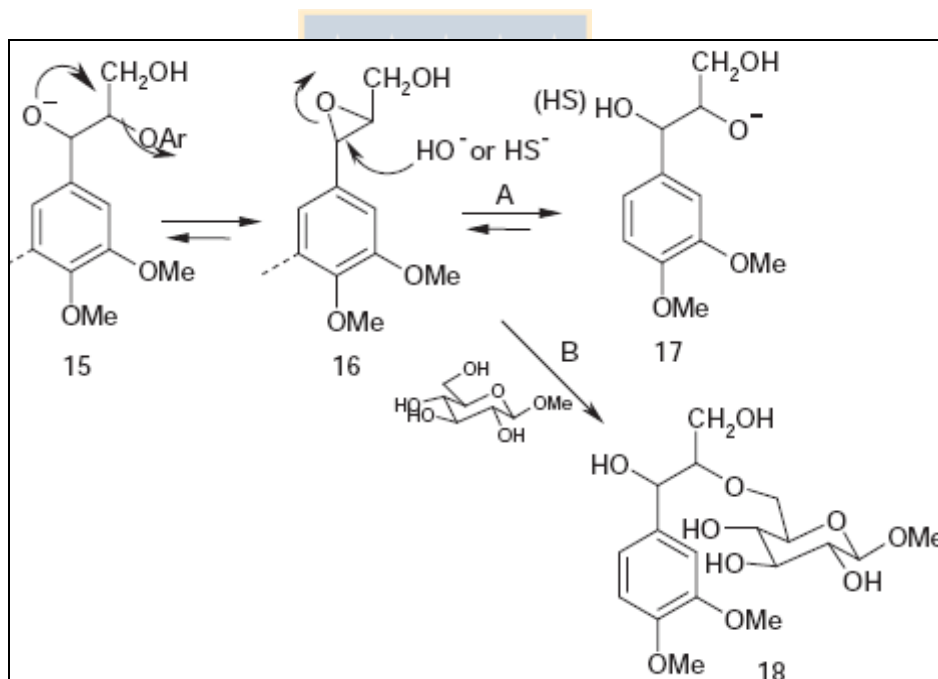


Figura 8: Formación LCC durante el pulpaje kraft (Sixta 2006).

Se ha sugerido que los enlaces covalentes entre la lignina y los xilanos en la madera junto a un alto contenido de ácidos urónicos favorecen la retención de xilanos en la pulpa (Saake *et al.* 2001, Köhnke 2010, Pinto *et al.* 2005a, Magaton *et al.* 2011, Magaton *et al.* 2013). Por otro lado, la reabsorción en la pulpa de los xilanos disueltos en el licor de pulpaje estaría asociada a estructuras con un bajo contenido de ácidos urónicos, a la formación de aglomerados entre las cadenas de xilano (Linder *et al.* 2003) y a la formación del complejo lignina-carbohidrato (LCC) durante el pulpaje (Saake *et al.* 2001, Danielsson 2007, Köhnke 2010). El efecto del peso molecular aun no es entendido completamente. Se ha indicado que una reducción en el peso molecular disminuiría la adsorción de los xilanos disueltos en el licor de cocción. Sin embargo, en el caso del *Eucalyptus globulus*, el peso molecular del xilano no sería el único factor a considerar, también sería importante los enlaces covalentes con la lignina y el grado de sustitución de los ácidos urónicos (Danielsson y Lindström, 2009). Además, se ha indicado que es necesario una cadena de la menos 15 unidades de xilosa para la adsorción de xilanos (Kabel *et al.* 2007, Danielsson 2007, Ahmad 2012). Los xilanos pueden ser retenidos en la superficie de la fibra, en los poros o por la superficie interna de las microfibrilas. La retención de hemicelulosas en la pulpa tiene un efecto de mejora en la resistencia a la tracción de la pulpa, esto se explicaría por una mayor tendencia a la hinchazón de la fibra, lo que facilitaría la refinación y daría flexibilidad a la fibra durante la formación del papel y/o un efecto de fortalecimiento directo de la fibra y de los enlaces entre fibras (Sixta 2006, Danielsson 2007, Köhnke 2010). Una menor degradación de los xilanos durante el proceso de pulpaje permitiría una mayor retención en la pulpa. La retención de xilanos en la pulpa se verá favorecida si la cadena de xilano presenta alto contenido de sustituyentes de ácidos metilglucurónicos. De acuerdo a Pinto *et al.* (2005) y Sixta (2006) los sustituyentes en la cadena de xilano obstaculizan significativamente la degradación alcalina, contribuyendo a la retención de xilanos en la pulpa. La formación de HexA a partir de MeGlcA también contribuye a la estabilización del extremos reductor de la cadena de xilano, además, una fracción significativa de unidades de MeGlcA continúan en la pulpa al finalizar el proceso de pulpaje, lo cual también puede contribuir a retardar la eliminación secuencial de los extremos reductores de la cadena de xilano durante la reacción de peeling (Pinto *et al.* 2005).

La industria forestal ha desarrollado investigaciones para seleccionar los mejores genotipos para la producción de pulpa con el fin de aumentar el volumen de madera y pulpa por hectárea. Para estimar las capacidades pulpables de un árbol, es importante incorporar las propiedades químicas y físicas de la madera, debido a que las propiedades pulpables de un árbol dependen de la cantidad, estructura y reactividad de las macromoléculas de la madera. Para evaluar el efecto de la variación de la composición química y estructural de los xilanos de genotipos de *E. globulus* contrastantes en densidad y rendimiento pulpable, se relacionara la composición estructural de los xilanos con las capacidades pulpables de los genotipos seleccionados. Se utilizaran varias técnicas de análisis para identificar la cantidad de los sustituyentes presentes en la cadena de los xilanos, como los ácidos metilglucurónicos; y se estudiará el efecto de su composición estructural en el rendimiento pulpable y en la retención de xilanos en la pulpa. Los resultados obtenidos contribuirán en los programas de selección de genotipos con características óptimas para la industria de pulpa kraft.



HIPÓTESIS

Genotipos de *Eucalyptus globulus* contrastantes en densidad básica de la madera y rendimiento pulpable presentan diferencias en la composición química y estructura de las hemicelulosas, estas diferencias se relacionan con el contenido de xilanos retenidos en pulpas kraft. Los genotipos con mayor rendimiento pulpable y mayor retención de xilanos serán aquellos que presenten xilanos con una mayor masa molar y una mayor cantidad de sustituyentes ácidos metilglucurónicos.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Determinar la existencia de diferencias en la composición química y estructural de los xilanos de genotipos contrastantes de *Eucalyptus globulus* y su relación con el rendimiento pulpable y la retención de xilanos en la pulpa.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar las características químicas y estructurales de los xilanos de genotipos contrastantes de *E. globulus*.
- Determinar las características químicas y estructurales de los xilanos retenidos en pulpas kraft de genotipos contrastantes de *E. globulus*.
- Relacionar las características químicas y estructurales de los xilanos de madera y pulpa con su retención en las pulpas y el rendimiento pulpable genotipos contrastantes de *E. globulus*.

4 METODOLOGÍA

4.1 Genotipos de *Eucalyptus globulus*

Genotipos de *Eucalyptus globulus* de 15 años de edad fueron proporcionados por una empresa forestal de la Región del Bío-Bío. Los genotipos fueron seleccionados desde un grupo que presentaba diferencias en densidad básica y en rendimiento pulpable. Se seleccionaron seis genotipos que presentaron una densidad básica entre 573 a 471 (kg/m³) y un rendimiento pulpable entre 54,4 a 49,8% respectivamente. Cantidad representativa de astillas de madera de cada genotipo fue astillada, molida en un molino de cuchillo y tamizada a 45/60 mesh. Para determinar la cantidad de extraíbles, la madera molida fue extraída con solución de acetona al 90% para luego ser utilizada en la caracterización química de madera y para la preparación de holocelulosa.

4.2 Preparación de holocelulosa

La holocelulosa fue preparada siguiendo el procedimiento descrito por Yokoyama *et al.* (2002). De la madera previamente extraída, se pesó 3 g y en un matraz erlenmeyer de 500 mL, se adicionó 60 mL de agua desionizada, 24 mL de ácido acético glacial y 60 mL de clorito sódico al 80%. El matraz erlenmeyer fue tapado con una tapa de vidrio y sumergido en un baño de agua a 90°C durante 1 h. Después de este período, otros 48 mL de ácido acético glacial y 120 mL de clorito sódico al 80% se agregaron al matraz, y la reacción se mantuvo por 1 h a 90°C. La reacción fue finalizada enfriando la muestra en un baño de agua a 10°C. Los sólidos fueron filtrados a través de un gooch N° 2, se lavó con 500 mL de agua desionizada, se secó a 105 °C hasta peso constante y reportados como holocelulosa.

4.3 Pulpaje kraft

Muestras de astillas de 100 g (peso seco) fueron sometidas a pulpaje kraft utilizando un reactor rotatorio de acero inoxidable de 4 unidades internas de 1 L de capacidad cada una. Las condiciones de operación utilizadas para obtener pulpas con un numero kappa entre 15 y 18 fueron una proporción astillas/licor de cocción de 1:4 con concentración de álcali efectivo (%AE) de 18%, con un 30% de sulfidez (expresados como equivalentes de NaOH). La temperatura máxima utilizada fue de 165 °C, con 50 min de calentamiento hasta llegar a 80 °C, 2

h de calentamiento desde 80 °C hasta llegar a 165 °C y 30 min de cocción a 165 °C. Finalizado el pulpaje, las pulpas fueron lavadas, clasificadas y secadas para determinación de rendimiento y para análisis de caracterización química.

El número kappa se obtuvo basado en la Norma TAPPI T236 om-99. La cuantificación de los HexA se realizó a través de la medición por espectroscopia UV del producto principal de la hidrólisis ácida de la pulpa con cloruro de mercurio (II) y acetato de sodio (Chai *et al.* 2001).

4.4 Aislación de Xilanos de holocelulosa y pulpa

Los xilanos fueron aislados desde holocelulosa de madera y pulpas kraft de *E. globulus*. Los xilanos de holocelulosa y pulpa fueron aislados utilizando solución alcalina de KOH de acuerdo a Shatalov *et al.* (1999). Cerca de 3 g de muestra fueron tratados con 100 mL de solución de KOH al 10% (p/v) a temperatura ambiente por 110 min en atmosfera inertizada con N₂. Finalizada la extracción, la muestra fue filtrada y lavada con 50 mL de solución de KOH y 150 mL de agua destilada. Se añadió al extracto alcalino 200 mL de ácido acético glacial y etanol hasta completar 2 L de solución que se mantuvo a 4 °C por 24 h para lograr la máxima precipitación de xilanos. El sobrenadante fue removido por centrifugación y el sólido obtenido fue re-precipitado 3 veces en 150 mL de agua destilada, se añadió metanol hasta completar 500 mL y se ajustó el pH con solución de KOH al 10% (p/v) para la precipitación final de los xilanos aislados. Los xilanos fueron liofilizados para posterior caracterización.

4.5 Análisis químicos

4.5.1 Caracterización química

La preparación de las muestras para análisis químico se realizó de acuerdo a la norma TAPPI T264 cm-97. La remoción de extraíbles desde madera molida se realizó con acetona de acuerdo a la norma TAPPI T280 pm-99. Las muestras de madera libre de extraíbles y las pulpas kraft de cada uno de los genotipos fue caracterizada en cuanto a su contenido de lignina y carbohidratos por hidrólisis ácida y metanólisis ácida de acuerdo a procedimientos descritos por Aguayo *et al.* (2010) y Sundberg *et al.* (1996), respectivamente.

Para determinar el contenido de lignina y carbohidratos, 300 mg de muestra se agregaron 3 mL H₂SO₄ al 72%, los que se hidrolizaron por 1 h en un baño de agua a 30 °C durante 1 h. El ácido se diluye a una concentración final de 4% y la mezcla es tratada en autoclave a 121 °C durante 1 h. El residuo se enfrió y se filtró obteniendo dos fracciones, sólida y líquida. Los sólidos se secaron hasta peso constante a 105 °C y se consideró el resultado como lignina insoluble. La concentración de lignina soluble en el hidrolizado fue determinado por la medición de la absorbancia a 205 nm y utilizando el valor de 110 L/g cm como la absorbancia de la lignina soluble (Dence 1992). La concentración de los azúcares monoméricos en la fracción soluble fue determinada por HPLC utilizando una columna BIORAD HPX-87H a 45 °C, con 5 mmol/L de ácido sulfúrico eluido con un flujo de 0,6 mL/min. Los azúcares fueron detectados en un detector de índice de refracción. La glucosa y la celobiosa fueron utilizadas como patrones de calibración externa. Los factores utilizados para convertir monómeros de azúcar a anhidro monómeros fueron de 0,90 para la glucosa en glucano, 0,92 para celobiosa a glucano, 0,88 para xilosa a xilano y 0,72 para ácido acético a acetilo.

La composición detallada de las hemicelulosas se determinó mediante metanólisis ácida. En un matraz de vidrio con forma de corazón se agregó 10 mg de madera y 2 mL de solución 2 M de HCl en metanol anhidro. El matraz fue cerrado y colocado por 3 h en estufa a 100 °C. Posteriormente, se agregó 100 µL de piridina, 4 mL de metanol conteniendo 0,1 mg/mL de estándar interno (sorbitol). Se tomó una alícuota de 1 mL y se evaporó a presión reducida en rotavapor por 10 min a 50 °C. Para disolver la muestra se agregaron 100 µL de piridina. Para la sililación se adicionaron 150 µL HMDS (hexametildisilazano) y 80 µL TMCS (trimetilclorosilano) a la muestra. Luego de 4 h de derivatización, 1 µL de la muestra fue analizada por cromatografía de gases. La muestra fue inyectada en modo split (relación split 1:20 a 260°C) en una columna DB-5 (95% de dimetil polisiloxano, 5% difenil) de 30 m x 0,25 mm i.d x 0,25 µm de espesor de film. La temperatura de la columna fue de 100 °C aumentando 4 °C/min hasta 175 °C, luego 175 °C aumentando 12 °C/min hasta 290 °C. La temperatura del detector FID fue de 290 °C. Nitrógeno se utilizó como gas carrier. La cuantificación de los azúcares se realizó mediante curva de calibración construidas con estándares de grado cromatográfico de los siguientes compuestos arabinosa, ramnosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa y ácidos glucurónicos, y se considera los factores de respuesta en relación al estándar interno. Todos los análisis químicos se realizaron por triplicado y la desviación estándar de los análisis fue inferior al 5% del valor promedio.

4.5.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

El sistema SEC utilizado consistió de 3 columnas ultrahidrogel (porosidad de 120 Å, 250 Å y 500 Å, Waters Assoc. USA) unidas en serie con detector IR (Waters). Los análisis se realizaron a 30 °C utilizando como eluente solución alcalina (pH = 13) compuesta por hidróxido de sodio (0,2 M)/acetato de sodio (0,1M) con un flujo de 0,5 mL/min (Jacobs *et al.* 2001). Muestras secas de xilanos aislados fueron disueltas en la solución alcalina hasta obtener una concentración de 1% (p/v). Todas las muestras fueron filtradas en filtro de 0,45 µm antes de ser inyectadas. El volumen de inyección de muestra fue de 20 µL. Las columnas fueron calibradas utilizando estándares de pullulans (Polymer Laboratories) entre el rango de 0,8 a 100 kDa.

4.5.3 Espectroscopía 1H-RMN

Muestras secas de xilanos aislados fueron disueltas en D₂O. Los espectros de 1D ¹H-RMN fueron registrados a 25°C en un espectrómetro Bruker Avance 400 operando a 400 MHz, delay de relajación de 1 s, ángulo de pulso de 90° y 16 pulsos recogidos. El grado de sustitución del ácido metilglucurónico en la cadena de xilanos aislados desde la madera y pulpa, y el grado de sustitución de ácidos hexenurónicos (HexA) en xilanos de pulpa se determinó mediante la integración cuantitativa de las áreas de las señales en el espectro 1D ¹H-RMN (Teleman *et al.* 2000, Evtuguin *et al.* 2003, Magaton *et al.* 2013).

4.6 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante ANOVA para determinar diferencias significativas entre los genotipos ($p=0,05$) utilizando el software estadístico SAS System 9.0. Se realizó un análisis simultáneo de medias utilizando el test de Tukey. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con la retención de xilanos en la pulpa, a fin de determinar el efecto de la composición química y estructural de las hemicelulosas en el rendimiento pulpable de los genotipos contrastantes de *E. globulus*.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización química de madera y pulpa

Además de las diferencias previamente conocidas en densidad y rendimiento de pulpa, los seis genotipos contrastantes también presentan diferencias significativas en su composición química que podrían estar relacionadas con la habilidad pulpable (Tabla 1). Estas diferencias estarían principalmente relacionadas con el contenido de celulosa, que es más alta en el grupo I (53,3-52,2%) y mas baja en el grupo II (49,2-48,5%) y de lignina, que es más baja en el grupo I (24,9-24,1%) y mas alta en el grupo II (26,9-25,8%). El contenido de xilanos también es más bajo en el grupo I (11,6-11,2%) y mas alto en el grupo II (14,3-12,6%) sin embargo, los xilanos del grupo I permanecen retenidos en mayor proporción en la pulpa (64-58,7%) que los xilanos de el grupo II (50,69-42,97%). Esto indica que los xilanos del grupo I son más estables durante el proceso de pulpaje y que la retención parece estar más relacionadas con las características estructurales del polisacárido que con su contenido inicial en la madera. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos urónicos (determinado mediante metanólisis ácida) y en el contenido de grupos acetilos (determinado mediante hidrólisis ácida) entre los grupos de genotipos. La cantidad de galactosa encontrada en la madera se atribuye a la presencia de ácido metilglucurónico substituido en la posición O-2 por galacatosa (α -D-galactopiranososa) de acuerdo a lo reportado por Shatalov *et al.* 1999. Magaton *et al.* 2011 reportaron cantidades de galactosa entre 0.5-1% en xilanos aislados con KOH de diferentes especies de eucaliptus, incluyendo *E. globulus*.

Las pulpas obtenidas de los genotipos de *E. globulus* mostraron diferencias significativas en la retención de xilanos (Tabla 1). Estos resultados indican que las hemicelulosas de los genotipos del grupo I son más estables durante el proceso de pulpaje con respecto a las hemicelulosas de los genotipos del grupo II. Estudios realizados a diferentes especies de madera de eucaliptos mostró que una menor degradación de las hemicelulosa durante el procesos de pulpaje estaría asociado al grado de substitución del ácido metilglucurónico en la cadena del xilano (Pinto *et al.* 2005, Magaton *et al.* 2011, Magaton *et al.* 2013). Los ácidos metilglucurónicos pueden constituir puntos de enlace entre el xilano y otros polisacáridos en la pared celular, específicamente ramnosa, arabinosa, galactosa y glucanos, lo cual contribuye a retardar la degradación y disolución de los xilanos durante el pulpaje kraft (Pinto *et al.* 2005)

Tabla 1: Composición química de la madera y pulpa de los genotipos de *E. globulus*.

| Grupo Genotipos | I | | | II | | |
|--|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| | Eg1 | Eg2 | Eg3 | Eg4 | Eg5 | Eg6 |
| <i>Caracterización química de la madera</i> | | | | | | |
| Glucanos | 53.3 ^a | 53.8 ^a | 52.1 ^a | 49.2 ^b | 48.7 ^b | 48.5 ^b |
| Xilanos | 11.6 ^c | 11.6 ^c | 11.2 ^c | 12.6 ^b | 14.3 ^a | 13.8 ^a |
| Arabinanos | 0.1 ^b | 0.1 ^b | 0.2 ^a | 0.1 ^b | 0.2 ^a | 0.2 ^a |
| Galactanos | 1.5 ^c | 1.4 ^d | 1.8 ^a | 1.4 ^d | 1.7 ^b | 1.4 ^d |
| Mananos | 1.2 ^{bc} | 1.5 ^{ab} | 1.7 ^{ab} | 1.1 ^c | 1.9 ^a | 1.2 ^{bc} |
| Acetilos | 3.1 ^c | 3.0 ^d | 3.1 ^c | 3.1 ^c | 3.5 ^a | 3.3 ^b |
| Ác. Urónicos | 1.2 ^b | 1.0 ^c | 1.2 ^b | 1.0 ^c | 1.2 ^b | 1.3 ^a |
| Lignina | 24.1 ^c | 24.2 ^c | 24.9 ^{bc} | 26.9 ^a | 25.8 ^{ab} | 26.9 ^a |
| Extraíbles | 1.3 ^{bc} | 1.1 ^{bc} | 0.8 ^c | 1.3 ^{bc} | 1.7 ^{ab} | 2.4 ^a |
| <i>Caracterización química pulpa (18 %AE, 30% sulfidez)</i> | | | | | | |
| Rendimiento | 53 ^{ab} | 54.36 ^a | 52.74 ^{ab} | 50.8 ^{bc} | 52.38 ^{abc} | 49.8 ^c |
| Kappa | 16.24 ^{ab} | 14.91 ^b | 16.51 ^{ab} | 18.55 ^a | 18.93 ^a | 16.87 ^{ab} |
| HexA | 67.65 ^a | 58.24 ^e | 64.09 ^b | 60.5 ^{cd} | 58.87 ^{de} | 63.18 ^{bc} |
| Retención de Xilanos* | 58.74 ^b | 64.42 ^a | 56.65 ^b | 47.7 ^{cd} | 42.97 ^d | 50.69 ^c |

Letras distintas indican diferencias significativas entre los genotipos con un nivel de confianza del 95%.*: expresado en relación a la cantidad inicial en madera

Los resultados obtenidos de la caracterización química de la madera y pulpa mostraron diferencias significativas en algunos parámetros entre los 6 genotipos analizados (Tabla 1). Las características químicas de la madera y pulpa de los grupos I y II mostraron diferencias significativas en el contenido de celulosa, lignina, xilanos, acetilos y extraíbles en la madera; y en rendimiento pulpable, número kappa y retención de xilanos en las pulpas.

5.2 Caracterización estructural de los xilanos aislados de madera y pulpa

Los xilanos fueron aislados desde holocelulosa de madera y pulpas kraft con KOH al 10%, con rendimientos superiores al 85% y 60%, respectivamente. Valores similares fueron obtenidos por Magaton *et al.* (2013) para otras especies de eucaliptus. Los xilanos fueron recuperados añadiendo ácido acético glacial y etanol al extracto resultante (Figura 9).

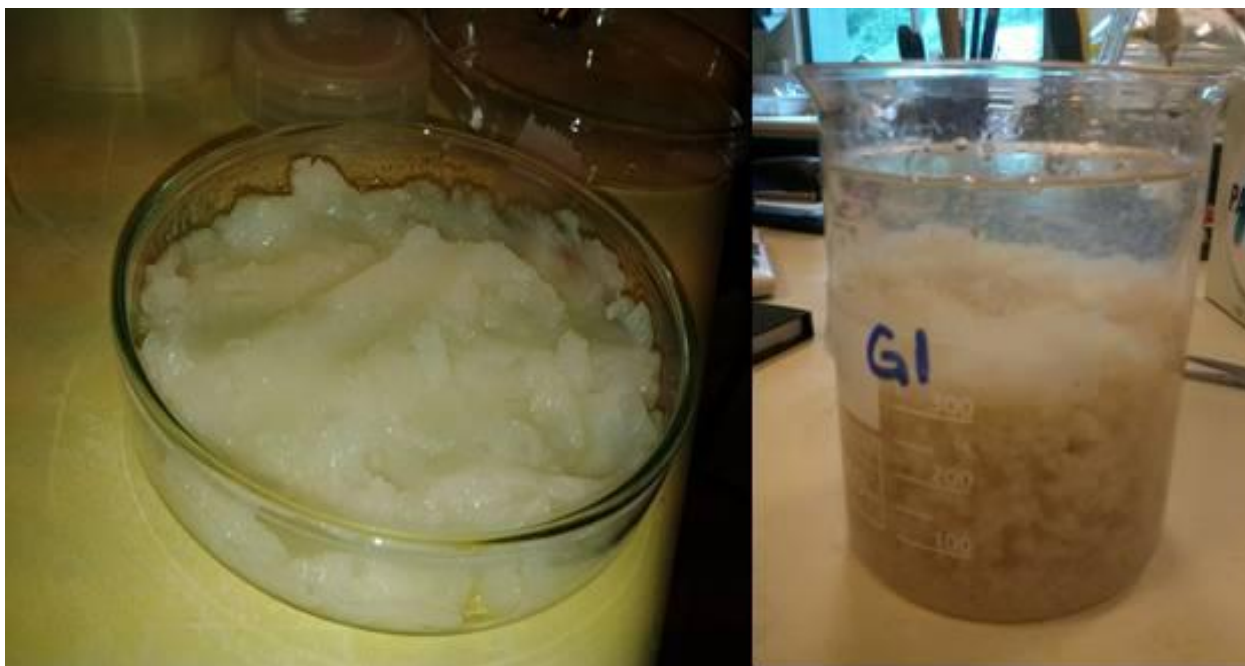


Figura 9: Muestras de xilanos aislados desde holocelulosa y pulpa kraft.

Las muestras de xilanos aislados desde holocelulosa de madera y pulpa fueron analizadas con el objetivo de determinar si presentaban tamaños de cadena distintos que pudieran estar relacionados con su retención en la pulpa.

La caracterización estructural por ^1H -RMN de los xilanos aislados de holocelulosa revelaron señales de protón entre 2,50 y 5,35 ppm, mientras que los xilanos aislados de pulpas mostraron señales entre 3,08 y 5,73 ppm (Figura 10). La asignación de las señales se basó en estudios previos de caracterización estructural de hemicelulosas por RMN (Shatalov *et al.* 1999, Teleman *et al.* 2000, Evtuguin *et al.* 2003, Pinto *et al.* 2005)

La señal del protón H1 en la estructura del ácido 4-O-metilglucurónico no sustituido (MeGlcA) apareció entre 5,20 a 5,27 ppm. La señal del protón H1 de la estructura del ácido 4-O-metilglucurónico sustituido en O-2 por galactosa (MeGlcA-2Ga) apareció en 5,35 ppm, la señal del protón H1 de la estructura galactopiranososa (Galp) sustituida en la posición O-2 aparece entre 5 y 5,01 ppm (Figura 10-A).

En las muestras de xilanos aislados desde pulpa la señal del proton H4 del ácido hexenurónico (HexA) apareció en 5,73 ppm (Figura 10-B). Las señales 4,55, 3,5 y 3,47 se asignaron a los protones H1, H2 y H5ax de la estructura xilopiranososa acetilada en la posición 3 (Xyl-3Ac). La señal del protón H1 en la estructura xilopiranososa unida a una estructura xilopiranososa acetilada (Xyl-(Xyl-Ac)) apareció entre 4,44 a 4,39 ppm. La señal del protón H5eq de la estructura xilopiranososa acetilada en la posición 2 y 3 (Xyl-2,3Ac) apareció entre 4,24 a 4,28 ppm. La señal del protón H4 de la estructura de xilopiranososa sustituida en la posición 3 (Xyl-3Ac) apareció entre 3,9 a 3,92 ppm. La señales 3,85 y 3,45 se asignaron a los protones H4 y H5ax de la estructura xilopiranososa acetilada en la posición 2 (Xyl-2Ac). La señal del protón H3 de la estructura de xilopiranososa sustituida en O-2 (Xyl-2GlcA) apareció entre 3,7 a 3,72 ppm. La señal del protón H2 de la estructura xilopiranososa no sustituida (Xyl) apareció entre 3,29 a 3,35 ppm. La numeración de los protones en las unidades monomericas en la estructura representativa del xilano se presenta en la figura 11.

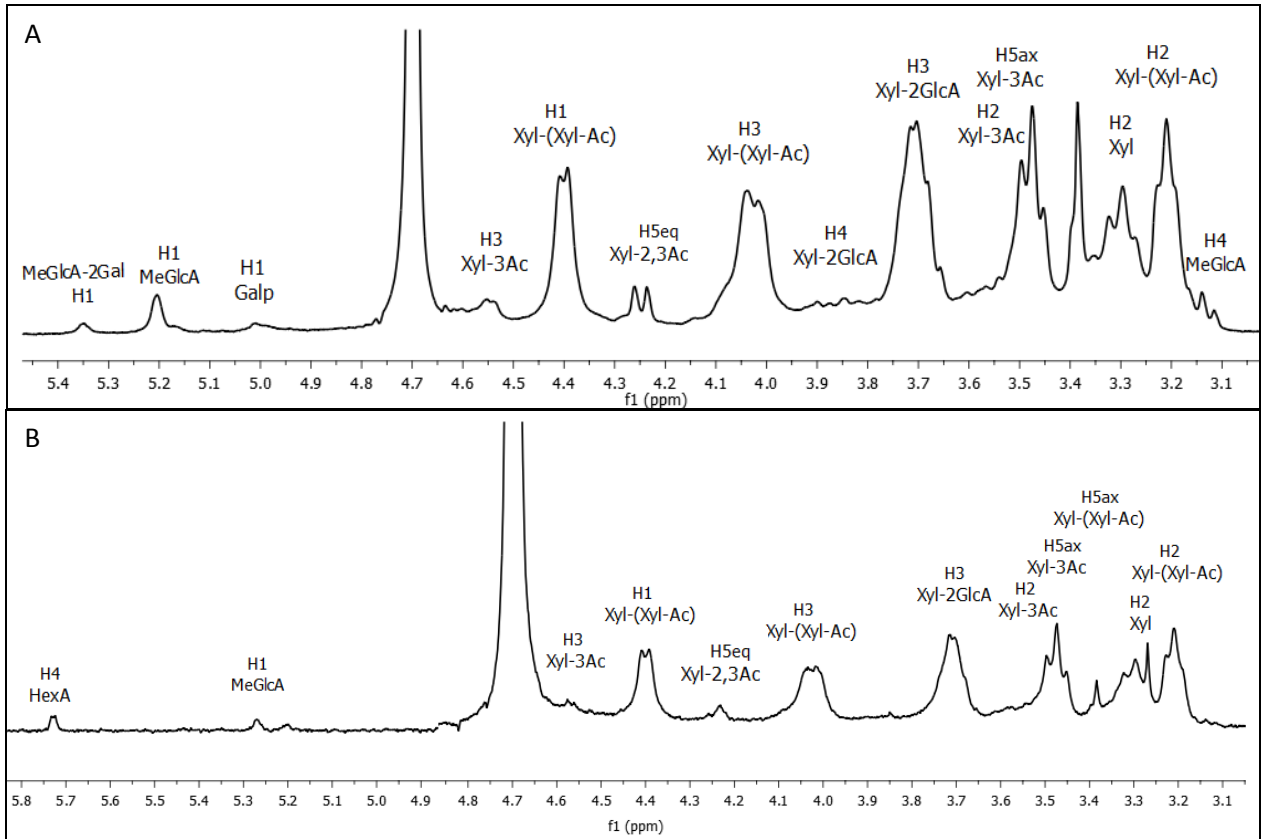


Figura 10: Espectro ^1H -RMN de la muestra de xilano aislado desde holocelulosa (A) y pulpa (B) del genotipo Eg1.

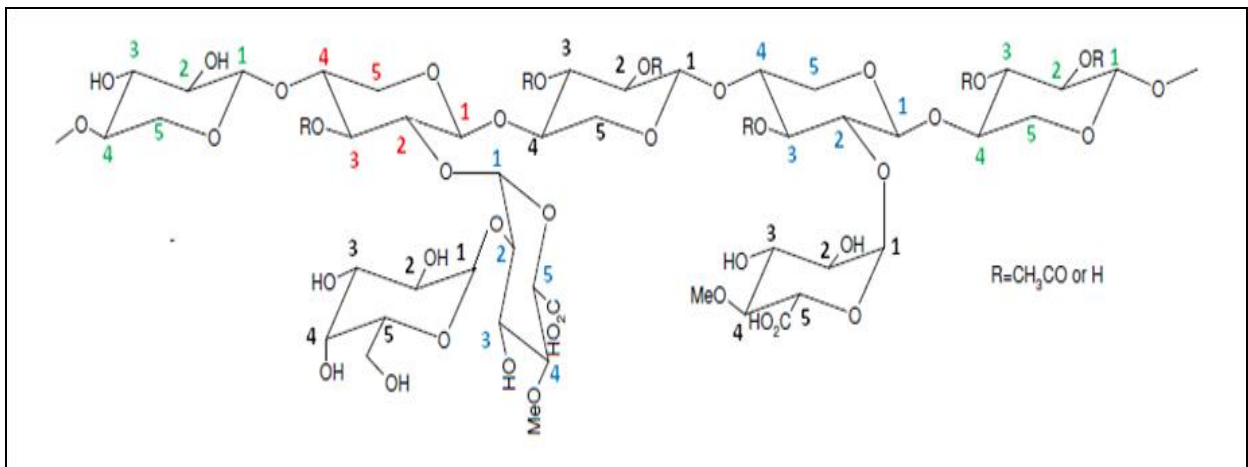


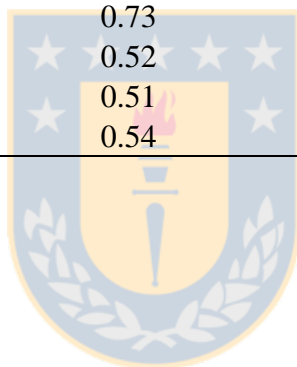
Figura 11: Numeración de los protones en una estructura representativa de xilano de *E. globulus*.

El grado de sustitución del ácido metilglucurónico en las muestra de xilanos aislados (DS_{MeGlcA}) y el grado de sustitución del ácido hexenurónico en las muestras de xilanos aislados desde pulpa (DS_{HexA}), se determinó mediante la integración cuantitativa de las aéreas de las señales en el espectro 1H -RMN de las muestras de los genotipos analizados en este estudio (Tabla 2), de acuerdo a metodologías descritas en estudios previos de caracterización estructural de hemicelulosas por RMN de protón (Teleman *et al.* 2000, Teleman *et al.* 2002, Evtuguin *et al.* 2003, Magaton *et al.* 2013). Los genotipos analizados mediante 1H -RMN presentan diferencias en el grado de sustitución (DS_{MeGlcA}) del ácido metilglucurónico. Los xilanos aislados desde holocelulosa de los genotipos del grupo I presentaron valores mayores de DS_{MeGlcA} (1.4 - 1.9 MeGlcA/10 unidades de xilosa) en comparación al los genotipos del grupo II (0.9 - 1.3 MeGlcA/10 unidades de xilosa). Los xilanos aislados desde pulpa también presentan diferencias en los valores de (DS_{MeGlcA}) y (DS_{HexA}) entre los grupo I y II (Tabla 2).

De acuerdo a Pinto *et al.* (2005) y Sixta (2006) los substituyentes en la cadena de xilano obstaculizan significativamente la degradación alcalina, contribuyendo a la retención de xilanos en la pulpa. La formación de HexA a partir de MeGlcA también contribuye a la estabilización del extremos reductor de la cadena de xilano, además, una fracción significativa de unidades de MeGlcA continúan en la pulpa al finalizar el proceso de pulpaje, lo cual también puede contribuir a retardar la eliminación secuencial de los extremos reductores de la cadena de xilano durante la reacción de peeling (Pinto *et al.* 2005). Los resultados obtenidos de (DS_{MeGlcA}) y (DS_{HexA}) entre los grupo I y II, y la retención de xilanos en la pulpa fueron relacionados obteniéndose buenas correlaciones entre las variables (Figura 12). Por lo tanto, la retención de xilanos en la pulpa estaría relacionada estrechamente a las características estructurales de las hemicelulosas en la madera, en este caso, al grado de sustitución de los ácidos metilglucurónicos en los xilanos en madera de los genotipos analizados en este estudio.

Tabla 2: Grado de sustitución (DS_{MeGlcA}) del MeGlcA y de los HexA (DS_{HexA}) por cada 10 unidades de xilosa en las muestras de xilanos aislados desde holocelulosa y de pulpa kraft de los genotipos de *E. globulus*.

| | DS_{MeGlcA} [Total MeGlcA/ 10 unidades de xilosa] | DS_{HexA} [Total HexA/ 10 unidades de xilosa] |
|---|---|---|
| <i>Xilanos aislados desde holocelulosa</i> | | |
| Eg1 | 1.21 | - |
| Eg2 | 1.86 | - |
| Eg3 | 1.67 | - |
| Eg4 | 1.31 | - |
| Eg5 | 0.92 | - |
| Eg6 | 0.99 | - |
| <i>Xilanos aislados desde pulpa kraft</i> | | |
| Eg1 | 0.65 | 0.66 |
| Eg2 | 0.70 | 0.75 |
| Eg3 | 0.73 | 0.63 |
| Eg4 | 0.52 | 0.57 |
| Eg5 | 0.51 | 0.58 |
| Eg6 | 0.54 | 0.52 |



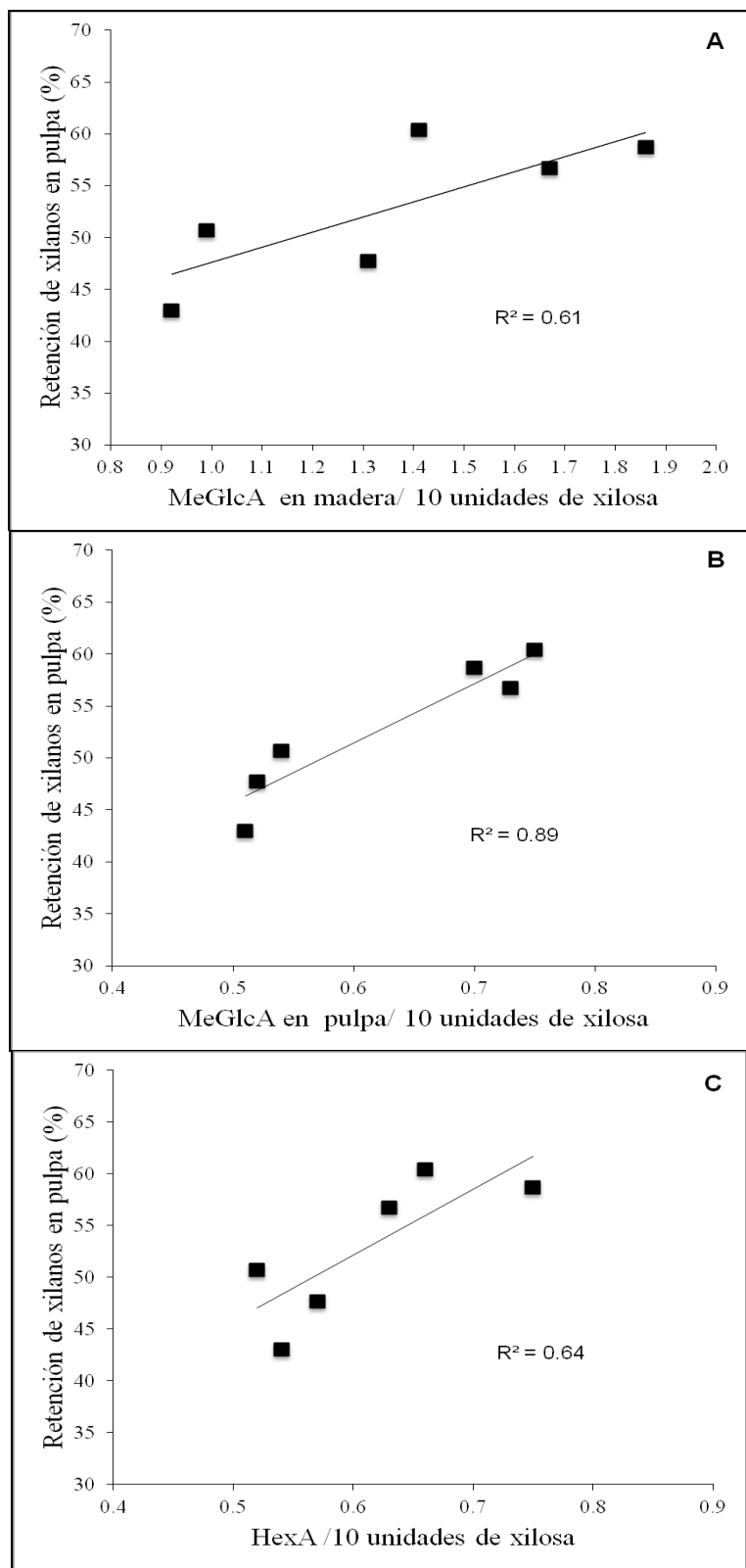


Figura 12: Efecto de DS_{MeGlcA} en los xilanos de madera y pulpa (A y B) y DS_{HexA} en los xilanos de pulpa (C) sobre la retención de xilanos en pulpa.

5.3 Distribución de masas molares de los xilanos aislados

Las muestras de xilanos aislados desde holocelulosa y pulpa presentan polisacáridos neutros con tiempos de retención entre 35 a 45 minutos (Figura 13). Los tiempos retención fuera de este rango se atribuyen a polisacáridos cargados en la muestra que pasan más rápido a través de las columnas y sus tiempos de retención son menores con respecto a los polisacáridos neutros en la muestra (Jacobs *et al.* 2001, Jacobs *et al.* 2002, Jacobs *et al.* 2003 Teleman *et al.* 2003). Los tiempos de retención de los polisacáridos neutros en las muestras de xilanos aislados se atribuye solo al tamaño de las moléculas en la muestra (Teleman *et al.* 2003).

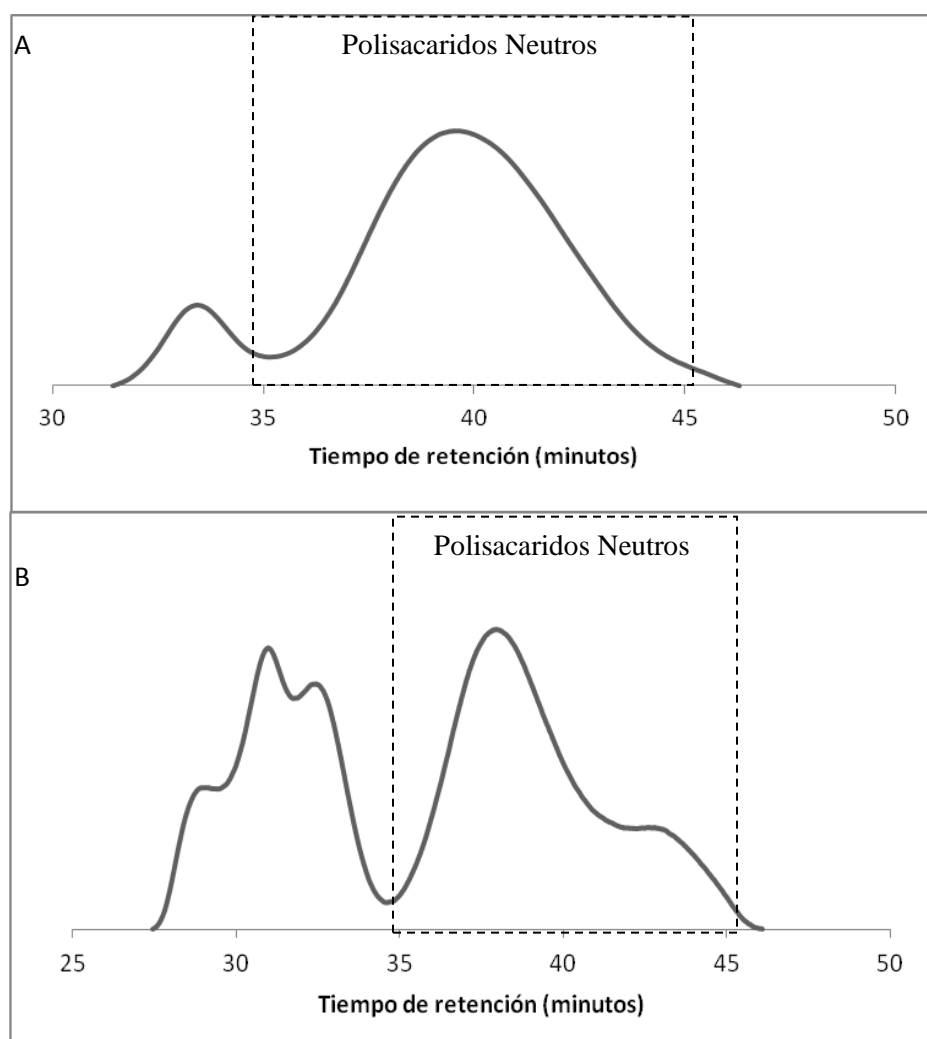


Figura 13: Distribución de masa molar de los xilanos aislados desde holocelulosa (A) y pulpa (B) del genotipo Eg1.

La distribución de masa molar presenta diferencias entre los xilanos aislados desde holocelulosa de los 6 genotipos, lo cual se ve reflejado en los valores de número de masa molar promedio (Mn), peso molecular promedio (Mw) y polidispersidad (Mw/Mn) de las muestras (Tabla 3).

Tabla 3: Masa y número de la masa molar promedio (Mw y Mn) y la polidispersidad (Mw/Mn) de los xilanos aislados de los genotipos de *E. globulus*.

| Grupo Genotipo | I | | | II | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Eg1 | Eg2 | Eg3 | Eg4 | Eg5 | Eg6 |
| <i>Xilanos de holocelulosa</i> | | | | | | |
| Mn | 23027 | 19681 | 21646 | 21197 | 18773 | 21295 |
| Mw | 33571 | 33294 | 33744 | 32602 | 30955 | 32335 |
| Mw/Mn | 1.45 | 1.49 | 1.56 | 1.53 | 1.65 | 1.51 |
| <i>Xilanos de pulpa</i> | | | | | | |
| Mn | 35131 | 19579 | 34311 | 32100 | 33400 | 35251 |
| Mw | 48191 | 43204 | 48881 | 39394 | 38949 | 46174 |
| Mw/Mn | 1.37 | 2.18 | 1.42 | 1.22 | 1.16 | 1.3 |

Los xilanos aislados desde holocelulosa del grupo I presentan valores de Mw (33,7-33,2 kDa) ligeramente más altos con respecto al grupo II (32,6-30,9 kDa). Evtuguin *et al.* (2003), Pinto *et al.* (2005) y Magaton *et al.* (2011) reportaron valores de Mw de 36 kDa, 31 kDa y 26 kDa respectivamente, para xilanos aislados desde la madera de *E. globulus*, lo cual estaría de acuerdo a los valores encontrados para Mw en este estudio.

Los análisis realizados a las muestras de xilanos aislados desde pulpa presentaron tendencias similares (Tabla 3), sin embargo, los valores de Mw, Mn y Mw/Mn fueron superiores a los reportados por estudios anteriores. Pinto *et al.* (2005) y Magaton *et al.* (2011) reportaron valores de Mw de 16 kDa y 19,5 kDa respectivamente, para xilanos aislados desde pulpa kraft de *E. globulus*. Estos resultados se deberían a las interacciones entre las cadenas de xilanos y la lignina residual en la pulpa kraft (Saake *et al.* 2001, Danielsson 2007, Köhnke 2010). Estas interacciones formarían ‘agregados de xilano’ junto con lignina residual (Danielsson 2007, Westbye *et al.* 2006). La formación de agregados de xilanos en la solución de fase móvil aumentaría el tamaño de las moléculas de los polisacáridos en las muestras de xilanos aislados desde pulpa kraft (Tabla 3).

Magaton *et al.* (2013) mostró que las diferencias en los valores de Mw encontradas en diferentes especies de eucalyptus estaria realcionada a la retención de xilanos en la pulpa. En este estudio, los resultados obtenidos de Mw en los xilanos aislados desde holocelulosa y la retención de xilanos en la pulpa fueron relacionadas obteniendo una buena correlación entre ambas variables (Figura 15), este resultado indicaría que las características estructurales de los xilanos (grado de sustitución ácidos metilglucurónicos) y los valores de masa molar serian variables a considerar para diferenciar los xilanos de los dos grupos de genotipos con respecto a su retención de xilanos en la pulpa.

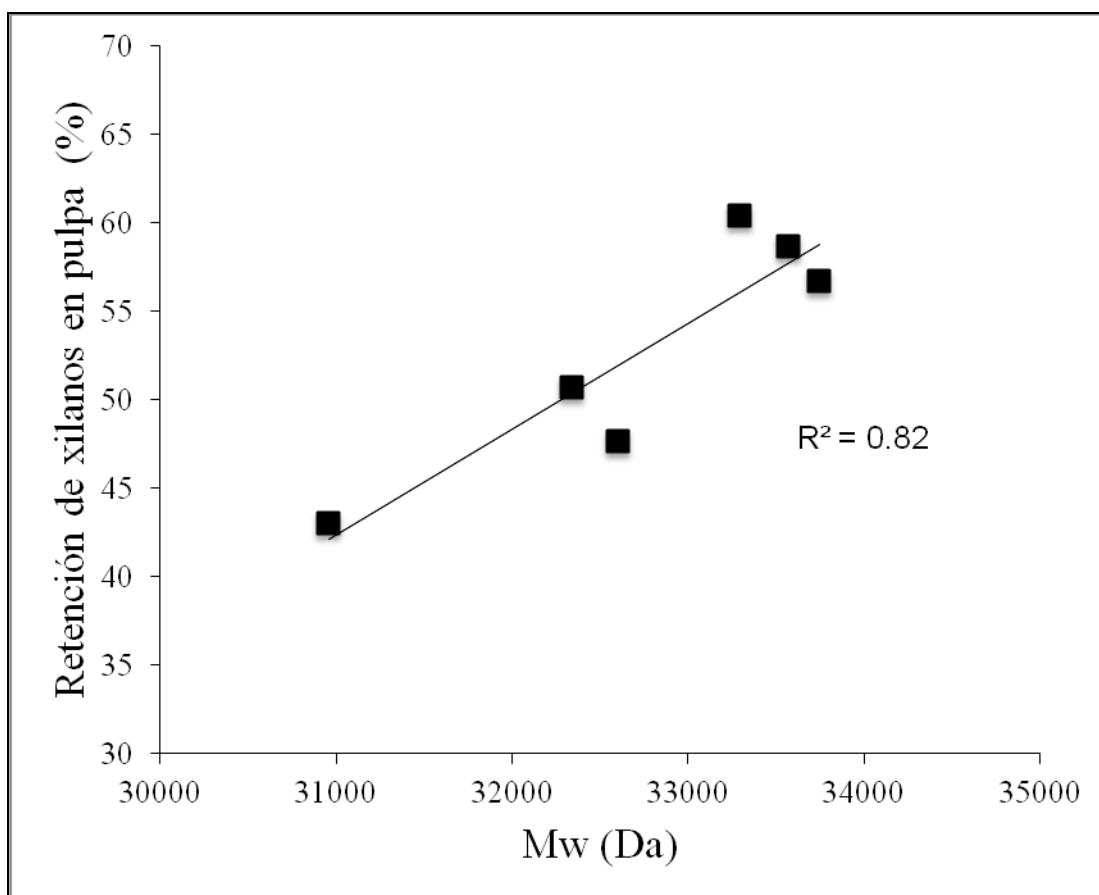


Figura 14: Efecto de Mw sobre la retención de xilanos en pulpa

La retención de xilanos en la pulpa y el rendimiento pulpable estarían asociados a las características estructurales de los xilanos y no a la cantidad inicial de xilanos en madera de acuerdo a los resultados obtenidos de la caracterización química y estructural de los xilanos aislados desde madera y pulpa.

Un mayor grado de sustitución de MeGlcA y Hexa en las muestras de xilanos aislados desde holocelulosa y pulpa kraft, estaría relacionado directamente con una mayor retención de xilanos en la pulpa y a un mayor rendimiento pulpable.



CONCLUSIONES

De acuerdo a la hipótesis, los xilanos aislados desde holocelulosa y pulpa kraft de genotipos seleccionados con diferente densidad básica y rendimiento pulpable, presentan diferencias en la composición química y estructura de las hemicelulosas (xilanos) en la madera y en la proporción de xilanos retenidos en la pulpa kraft. Estas diferencias están relacionadas con una mayor masa molar, mayor grado de sustitución del ácido metilglucurónico en los xilanos aislados desde holocelulosa y pulpa (DSMeGlcA) y con el grado de sustitución del ácido hexenurónico en los xilanos aislados desde pulpa (DSHexA) en los genotipos con mayor rendimiento pulpable



REFERENCIAS

- Ahmad Z. (2012). Xylan as Strength Enhancing Additive, Master Thesis in pulp and paper technology, Stockholm, Sweden.
- Aguayo, M.G., Quintupill, L., Castillo, R., Baeza, J., Freer J. y Mendonça, R. (2010). Determination of differences in anatomical and chemical characteristics of tension and opposite wood of 8-year old *Eucalyptus globulus*. *Maderas, Ciencia y Tecnología*. 12: 241–251.
- Butterfield B. (2006). The structure of wood: form and function. In: *Primary Wood Processing*, Walker J.C.F. (Ed), Springer, Dordrecht. 1-22.
- Chai X, Zhu J, Li J. (2001). A simple and rapid method to determine hexenuronic acid groups in chemical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*. 27:165-170.
- Christiernin M., Ohlsson A., Berglund T., Henriksson G. (2005). Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant differences in lignin structure between primary and secondary cell wall, *Plant Physiology and Biochemistry*. 43:777-785.
- Danielsson S. and Lindström, M.E. (2005): Influence of birch xylan adsorption during kraft cooking on softwood pulp strength. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*. 20(4):436-441.
- Danielsson, S. (2007) Xylan reactions in kraft cooking; process and product considerations, Doctoral thesis in pulp and paper technology, Stockholm, Sweden.
- Danielsson, S., Lindström, M.E. (2009) The effect of black liquor exchange in the kraft cook on the tensile properties of *Eucalyptus Urograndis* pulp. *Jornal O Papel*. 70(4):35-50.
- Dence C.W. (1992). The determination of Lignin. Lin SY, Dence CW (Ed) *Methods in Lignin Chemistry*. Springer, Berlin. 33-61.
- Du J., Groover A. (2010). Transcriptional regulation of secondary growth and wood formation. *Journal of integrative Plant Biology*, 52:17-27.
- Ebringerova A. (2000). Xylan and Xylan Derivatives: Biopolymers with Valuable Properties 1, *Macromolecular Rapid Communications*. 21(9):542-556.

Ek M. (2009). Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 2: Pulping Chemistry and Technology. Göran Gellerstedt, Gunnar Henriksson, Hubert & Co. GmbH & Co. KG, Göttingen, Germany

Elissetche J.P., Valenzuela S., García R., Norambuena M., Iturra C., Rodríguez J., Mendonça R.T., Balochi C. (2011). Transcript abundance of enzymes involved in lignin biosynthesis of Eucalyptus globulus genotypes with contrasting levels of pulp yield and wood density. *Tree Genetics & Genomes*. 7:697–705

Evtuguin D., Tomas J., Silva A.S., Neto C. (2003) Characterization of an acetylated heteroxylan from Eucalyptus globulus Labill. *Carbohydrate Research*. 338:597-604.

Fengel D., Wegener G. (1984). Wood chemistry, ultrastructure, reactions. (Ed) Walter de Gruyter, Berlin-New York

Guerra A., Elissetche J., Norambuena M., Freer J., Valenzuela J., Rodríguez J., Balochi C. (2008). Influence of lignin structural on Eucalyptus globulus kraft pulping. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47:8542-8549.

Hillman, D. C. (2002). Single-species pulping. The world's preferred market pulps. *Solutions*, 11:27-30.

Jacobs A. and Dahlman O. (2001). Characterization of the Molar Masses of Hemicelluloses from Wood and Pulps Employing Size Exclusion Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Biomacromolecules* 2:894-905

Jacobs A., Lundqvist J., Stalbrand H., Tjerneld F., Dahlman O. (2002). Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectroscopy. *Carbohydrate Research* 337:711-717

Jacobs A., Palm M., Zacchi G., Dahlman O. (2003). Isolation and characterization of water-soluble hemicelluloses from flax shive. *Carbohydrate Research* 338:1869-1876.

Johansson D. (2008). Carbohydrate degradation and dissolution during kraft cooking: Modelling of kinetic results. Licentiate thesis, Faculty of Technology and Science Chemical Engineering, Karlstad University Studies

Kabel M. A., Van den Borne H., Vincken, J.-P., Voragen, A. G. J., Schols, H. A. (2007) Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydrate Polymers*. 69(1): 94-105

Köhnke T. (2010). Adsorption of xylans on cellulosic fibres: Influence of xylan composition on adsorption characteristics and kraft pulp properties. Doctoral thesis in pulp and paper technology, Göteborg, Sweden

Koshijima T. and Wananabe T (2003). Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues, Berlin, Germany, Springer.

Lawoko M. (2005). Lignin Polysaccharide Networks in Softwood and Chemical Pulps: Characterisation, Structure and Reactivity. 2005. Doctoral Dissertation, Stockholm.

Linder Å., Bergman R., Bodin A., and Gatenholm P. (2003): Mechanism of assembly of xylan on to cellulose surfaces. *Langmuir*, 19(12):5072–5077.

Lundquist K., Simonson R. and Tingsvik K (1982). Lignin carbohydrate linkages in milled wood lignin preparations from spruce wood. School of Chemical Engineering, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden.

Magaton, A.S., Colodette, J.L., Pilo -Veloso, D., Gomide, J.L. (2011) Behavior of eucalyptus wood xylans across kraft cooking. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 31:58-72.

Magaton A.S., Silva T., Colodette J., Pilo-Veloso D., Reis Milagres F. (2013). Behavior of xylans from Eucalyptus species. Part 1. The influence of structural features of eucalyptus xylans on their retention in kraft pulp. *Holzforschung*. 67(2):115–122.

Minic Z., Rihouey C., Trung Do C., Lerouge P. y Jouanin L. (2004). Purification and Characterization of Enzymes Exhibiting β -D-Xylosidase Activities in Stem Tissues of Arabidopsis. *Plant Physiology*. 135:867-87.

Mohammad J., Taherzadeh and Keikhosro Karimi (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production. School of Engineering, University of Borås, 501 90 Borås, Sweden; Department of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. 84156-83111.

Pereira L. (2003). The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova.* 26(6):863-871

Perrin R.M., DeRocher A.E., Bar-Peled M., Zeng W., Norambuena L., Orellana A., Natasha Raikhel N.V. and Kenneth Keegstra K. (1999). Xyloglucan Fucosyltransferase, an Enzyme Involved in Plant Cell Wall Biosynthesis, *Science.* 284(5422):1976-1979.

Pinto P.C., Evtuguin D.V., Pascoal Neto C. (2005). Pulping Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft. *Carbohydrate Polymers.* 60:489-497.

Ramírez M, Rodríguez J, Balocchi C, Peredo M, Elissetche JP, Mendonça R, Valenzuela S. (2009). Chemical composition and wood anatomy of *Eucalyptus globulus* clones: variations and relationships with pulpability and handsheet properties. *Journal of Wood Chemistry and Technology.* 29:43-58.

Roger M. and Rowell (2005). *Handbook of wood chemistry and wood composites*, University of Wisconsin, Madison, USA.

Saake B, Kruse Th. and Puls J. (2001). Investigation on Molar Mass, Solubility and Enzymatic Fragmentation of Xylans by Multi-detected SEC Chromatography, Elsevier, *Bioresource Technology.* 80:195-200

Santiago A.S and Pascoal Neto C. (2008). Improving the retention of polysaccharides during *Eucalyptus globules* kraft pulping assessment of potencial approaches. Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Scheller H. and Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses, Review in Advance first posted online on January 28, 2010. *Annual Review of Plant Physiology.* 61. Downloaded from arjournals.annualreviews.org by Universidad de Concepcion on 03/30/10

Sixta . *Handbook of Pulp Volume 1.* (2006). Herbert, WILEY-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, Weinheim.

Shatalov A.A., Evtuguin D.V. and Neto C.P. (1999). (2-O- α -D-Galactopyranosyl-4-Omethyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research.* 320:93-99.

Sjöberg, J., Kleen, M., Dahlman, O., Agnemo, R. and Sundvall, H. (2004): Fiber surface composition and its relations to papermaking properties of soda-anthraquinone and kraft pulps. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*. 19(3):392–396.

Sjöström, E. (1993) *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*. Second ed., San Diego: Academic press, Chapter 3.

Sun R., Lawther J.M., Banks W.B. (1998). Isolation and characterization of hemicellulose B and cellulose from pressure refined wheat straw. *Industrial Crops and Products*. 7:121-128.

Sundberg A., Sundber K., Lillandi C., Holmbom B. (1996) Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 4:139-141.

Teleman A., Lundqvist J., Tjerneld F., Stalbrand H., Dahlman O. (2000) Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 329:807-815.

Teleman A., Nordström M., Tenkanen M., Jacobs A., Dahlmana O. (2003) Isolation and characterization of O-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. *Carbohydrate Research* 338:525-534.

Tenkanen M., Tamminen T., Hortling B. (1999). Investigation of lignin-carbohydrate complexes in kraft pulps by selective enzymatic treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 241-248.

Timell, T.E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology*. 1:45–70.

Westbye P., Köhnke T., Glasser W., Gatenholm P. (2007). The influence of lignin on the self-assembly behavior of xylan rich fractions from birch (*Betula pendula*). *Cellulose*. 14:603-613.

Yokoyama T., Kadla JF. and Chang H.M. (2002) Microanalytical method for the characterization of fiber components and morphology of woody plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:1040-1044.