

# 2021 INFORME DE RESULTADOS



Proyectos

## “AGROFOREF”

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROFORESTALES MEDIANTE PROCESOS DE BIO-REFINADO PARA SU USO EN LA INDUSTRIA DE LA MADERA, EL MUEBLE Y LA CONSTRUCCIÓN

Informe de Resultados

Número de proyecto: 22100052

Expediente: MDEEA/2021/78

Duración: 01/07/2021 al 31/07/2022

Coordinado en AIDIMME por: MARCO ALEIXANDRE, ALICIA

Línea de I+D: BIOMATERIALES



GENERALITAT  
VALENCIANA

**IVACE**  
INSTITUTO VALENCIANO DE  
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL



Cofinanciado por  
la Unión Europea

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

A continuación, se describen las tareas realizadas y los resultados obtenidos en los Paquetes de Trabajo técnicos del proyecto AGROFOREF, es decir, los Paquetes de Trabajo del 4 al 6. Los primeros tres paquetes de trabajo corresponden a: PT1: Gestión y coordinación del proyecto, PT2: Difusión del proyecto y PT3: Transferencia y promoción de los resultados.

**PAQUETE DE TRABAJO 4.- IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS BIOMÁSICOS DEL SECTOR AGROFORESTAL Y SUS COMPONENTES DE INTERÉS.**

En el paquete de trabajo 4 se investigó sobre la existencia de biomásas que suponen un problema en zonas agrícolas y forestales, y se identificaron aquellas que pueden ser de interés por su elevada presencia y/o por sus compuestos químicos.

El procedimiento comenzó con la búsqueda bibliográfica de aquellas especies tanto forestales como agrícolas que pueden ser relevantes en el proyecto por su capacidad para ofrecer biomasa y que a su vez pertenezcan a las masas forestales de la Comunitat Valenciana.

Conocidas las especies de interés se estudió qué cantidad de biomasa hay actualmente y cuánta pueden aportar a lo largo del tiempo (posibilidad) sin sufrir un perjuicio en su masa, es decir, de manera sostenible en el tiempo. Además, estudiando qué cantidad y tipos de compuestos químicos ofrece cada biomasa.

El siguiente paso consistió en ir a campo para la recogida de muestras, en el caso de los nudos con ayuda de procesado por aserraderos y en el caso de la biomasa se realizó manualmente. Estas muestras se llevaron a AIDIMME y se trituraron para facilitar la extracción de compuestos químicos en una trituradora.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio preliminar de los compuestos químicos que ofrecen las diferentes especies analizadas a través de la biomasa obtenida.

**4.1 Identificación de los residuos biomásicos de interés de origen forestal y agrícola.**

En el presente proyecto se diferenció entre dos tipos de residuos biomásicos, los de origen forestal y agrícola.

Los residuos biomásicos de origen forestal son aquellos procedentes de actuaciones silvícolas como claras, claros y podas, entre otras, y los procedentes de residuos de aprovechamientos madereros como desrames, cortas intermedias, trasmochos entre otros.

Por otro lado, los residuos biomásicos agrícolas, son aquellos que se generan del aprovechamiento de los cultivos agrícolas que pueden ser herbáceos o lignocelulósicos. En este caso el proyecto se centró en los de origen lignocelulósico provenientes de los restos de poda anual.

Una vez identificados los posibles orígenes de los residuos biomásicos, se determinó cuáles son de



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

mayor interés dentro del territorio de la Comunitat Valenciana.

Dependiendo de la especie y lo que pueda ofrecer se analizaron: sus nudos, ramas, hojas, restos de poda, madera o cáscara.

#### 4.1.1 Origen forestal

Las especies de biomasa estudiadas de origen forestal han sido:

- *Pinus halepensis*: Pino carrasco (*Pinus halepensis*): está considerado el taxón fundamental de la Comunitat Valenciana, ocupando el 72% de la superficie arbolada (518.664 ha), estando presente en toda la comunidad autónoma con pinares más extensos en la provincia de Castellón e interior de Valencia. En este caso se obtuvo la biomasa de los nudos, ya que son un residuo de la producción en un aserradero (tablas, tableros, contrachapados, etc.) o de las ramas y hojas de los restos de poda o desbroces. Estos últimos se obtienen de la mejora de la masa para evitar incendio o favorecer el fuste (con fines madereros).
- *Pinus sylvestris*: es una de las principales especies forestales de altitudes elevadas, estando presente en la Comunitat Valenciana en zonas montañosas del interior de Castellón y Valencia ocupando una superficie de unas 6.765 hectáreas. En este caso se aprovechó la biomasa que aportan los nudos ya que se considera un residuo de la fabricación de tableros, contrachapados, etc.
- *Pinus pinea*: tienen escasa representación en la Comunitat (1.570 ha), apareciendo fundamentalmente en la provincia de Alicante, sin embargo, hay amplias zonas en la región valenciana donde podría desarrollarse. Por otro lado, existen varios individuos que se han plantado ornamentalmente. De esta especie para transformación en biomasa del proyecto se pueden dedicar las piñas. Las piñas son una parte del pino que pueden contener compuestos químicos interesantes y, además, es un residuo de la producción del piñón, pues una vez extraído el piñón en sí, queda todo el resto de piña.
- *Juniperus oxycedrus*: los enebrales arbóreos se localizan de forma escasa dentro de la Comunitat Valenciana en el interior montañoso de la provincia de Castellón. Esta escasez se debe a su aprovechamiento secular. Actualmente la formación más predominante es en forma de matorrales arborescentes que corresponden a bosquetes en regeneración que ya fueron explotados. Esta especie tiene un crecimiento lento y se busca mantenerla mejorando aquellos pies que tengan mayor futuro. Por ese motivo, la biomasa en este caso se obtiene de las ramas y hojas (restos de poda) que provienen de la mejora de dichos pies. En algunos casos en los que no existe esa opción, para evitar el riesgo de incendios, se tienen que cortar determinados pies. Esos pies también se pueden destinar a la producción de la biomasa.
- *Tamarix sp.*: El Taray comprende un conjunto de especies de porte arbustivo y arbóreo muy ramificado. Se encuentran principalmente en suelos parcialmente encharcados como son las riberas o ramblas. Al ser ésta una especie de ribera se elimina en aquellas ocasiones que se requiere una limpieza por motivos de seguridad ambiental. Por esa razón quedan las ramas y hojas sin aprovechamiento y acaban siendo un residuo. Por tanto, en este caso lo que se utiliza como biomasa son las ramas y hojas de esta especie o en algunos casos los pies



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

enteros que tienen dimensiones similares a las ramas.

#### 4.1.2 Origen agrícola

Las especies de biomasa estudiadas de origen agrícola han sido:

- *Olea europaea*: es un pequeño árbol perennifolio con elevada longevidad. De esta especie se aprovecha su fruto que es la oliva y de la que se obtiene también el aceite. Para favorecer la recogida de la oliva, todos los años se realiza una poda que consigue recortar la altura del árbol y así poder alcanzar las olivas que se encuentran a más altura desde el suelo. Comúnmente se localiza en altitudes de entre 600-700 m.s.n.m. aunque puede tener variaciones. En concreto (en 2020) ocupaba una superficie de 93.953 ha en la Comunitat Valenciana. En este caso, para mejorar la producción del olivo se corta tanto ramas y hojas en verde como ramas secas consideradas como madera. Al final, ese proceso es necesario para el olivo, pero es un residuo y, por tanto, es lo que se considera como biomasa para el proyecto.
- *Citrus sp.*: el naranjo es un árbol frutal de porte mediano que habita en altitudes generalmente menores de 250 m.s.n.m. Está muy presente en la Comunitat Valenciana cercano a la costa debido a su limitación altitudinal. Funciona como un cultivo agrícola para producir la naranja. La naranja es un fruto del que se aprovecha el interior de éste, ya que la corteza o cáscara no sirve de alimento y acaba siendo un residuo. El caso más aparente es el de las empresas de producción de zumo, que desechan dichas cáscaras. Por ello, en el caso de la naranja se utiliza como biomasa su cáscara para obtener de ahí los compuestos químicos.

A continuación, se muestra un esquema resumen de las especies que se han estudiado y qué parte de cada una se utiliza, las cuales constituyen las diferentes biomásas de este proyecto.

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción



**4.2 Cuantificación de los residuos biomásicos y posibilidad de explotación.**

En el territorio de la Comunitat Valenciana existe gran recurso de biomasa, pero se debe diferenciar entre la biomasa forestal y la biomasa agrícola, pues hay que gestionarla de forma distinta. Además, los datos aportados por la bibliografía tienen variaciones y se tiene que describir cada una de manera diferente.

**4.2.1 Biomasa forestal**

En los ecosistemas forestales de la Comunitat Valenciana, existe una gran disponibilidad de biomasa forestal. Considerando como recurso disponible únicamente aquella biomasa que permite gestionar de forma sostenible las masas forestales, de forma que aumente la estabilidad de los ecosistemas forestales a medio y largo plazo, se estima que, en los montes valencianos, se dispone de más de 200.000 toneladas/año de biomasa forestal potencial, de las cuales el 31 % se encuentra en montes gestionados por la Generalitat [1].

Junto a ese dato y para demostrar que la extracción de esas 200.000 toneladas sería una extracción sostenible, se investiga la cantidad total de biomasa forestal que hay en la Comunitat Valenciana. Según el IFN3 la biomasa total disponible de ese monte arbolado es de 13.386.257 toneladas de materia seca [2]. Por ese motivo, la extracción de 200.000 toneladas respecto a los 13 millones

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

existentes no sería significativa para producir un daño, al contrario, sería una mejora para la masa. Esa mejora se puede ver reflejada en una disminución del riesgo de incendios o patologías y de un aprovechamiento sostenible a lo largo del tiempo.

La mayor disponibilidad de biomasa forestal se concentra en los municipios de interior de las provincias de Castellón y Valencia, de carácter más forestal. La escasa gestión forestal que se realiza, junto a la ausencia de instrumentos de gestión tanto en terreno público como privado, hace que todo este material esté inmovilizado y disponible en el monte [1].

La biomasa forestal residual sigue la misma distribución territorial general que la biomasa forestal total, siendo la comarca con más disponibilidad Els Ports, con 17.000 t/año, seguida de la Plana de Utiel-Requena, los Serranos, el Alto Palancia y El Valle de Cofrentes-Ayora, todas ellas con más de 10.000 t/año de biomasa forestal residual [1].

Las especies más interesantes para la extracción de la biomasa dentro de la Comunitat Valenciana son aquellas que se estudian en puntos anteriores. Ese interés viene dado por varios motivos: ser más abundantes dentro de las masas forestales, tener mayor capacidad de producción, requerir una gestión para mejorar su masa y saber que producen compuestos químicos interesantes para el proyecto entre otros motivos.

Las especies de estudio son:

- *Pinus halepensis*
- *Pinus sylvestris*
- *Pinus pinea*
- *Juniperus oxycedrus*
- *Tamarix sp.*

En el PLAN DE ACCIÓN TERRITORIAL FORESTAL DE LA COMUNITAT VALENCIANA [3] aparece un listado detallado de la superficie forestal arbolada que ocupa cada una de esas especies.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

**Tabla 1: Superficie forestal arbolada que ocupan las especies estudiadas.**

		<b>Ecosistemas</b>	<b>Superficie (ha)</b>
	<b>Cupresáceas</b>	Arbolado de <i>Juniperus Thurifera</i>	4.015
		Arbolado de <i>Pinus halepensis</i>	518.664
<b>Coníferas</b>	<b>Pináceas</b>	Arbolado de <i>Pinus nigra</i>	45.261
		Arbolado de <i>Pinus pinaster</i>	19.927
		Arbolado de <i>Pinus pinea</i>	1.572
		Arbolado de <i>Pinus sylvestris</i>	6.766
		Arbolado de <i>Quercus faginea</i>	5.669
<b>Frondosas quercíneas</b>		Arbolado de <i>Quercus ilex</i>	95.729
		Arbolado de <i>Quercus suber</i>	6.700
<b>Otras</b>		Otras formaciones arbóreas	11.287
		Vegetación de ribera	4.337
<b>Total</b>			<b>719.927</b>

Como se puede apreciar en la Tabla 1 los valores de los pinos los detalla exactamente, sin embargo, el *Juniperus* y el *Tamarix* no los refleja con ese detalle.

En el caso del *Juniperus oxycedrus* (enebro) se puede ver cómo, una especie similar, que es el *Juniperus thurifera* (sabina) tiene una superficie de 4.015 ha y otras formaciones arbóreas dentro de las que entra el enebro ocupan 11.287 ha. Por esos motivos se estima que el enebro ocupa una superficie en torno a 3.000 ha dentro de las formaciones forestales arboladas de la Comunitat Valenciana.

La situación del *Tamarix* es diferente, es una especie con alta presencia dentro de la vegetación de ribera. Como se puede ver en la tabla la superficie de la vegetación de ribera es de 4.337 ha, y teniendo en cuenta la alta presencia del *Tamarix* se estima una superficie de presencia de unas 2.000 ha dentro del monte arbolado de la Comunitat Valenciana.

Los datos de biomasa hacen referencia generalmente a las ramas y hojas (restos de poda) o a troncos de un tamaño mínimo. Lo que ocurre con los nudos y las piñas es que no se pueden determinar por lo que no se van a reflejar en la estimación de la posibilidad de biomasa. Entonces quedan fuera de la estimación los nudos de *Pinus halepensis* y *Pinus sylvestris* y las piñas de *Pinus pinea*.

Los nudos y las piñas son un residuo de la industria forestal que, aunque es difícil cuantificar su posibilidad, pueden tener un potencial a pequeña escala y son de interés.

A partir de los datos estudiados se estima la posibilidad de biomasa en toneladas de materia seca que ofrece el monte de la Comunitat Valenciana.

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

Tabla 2. Estudio de la posibilidad anual de biomasa forestal

	SUPERFICIE (ha)	BIOMASA (toneladas/año)
<b>TOTAL MONTE ARBOLADO DE LA COMUNITAT VALENCIANA</b>	<b>719.927</b>	<b>200.000</b>
<i>Pinus halepensis</i>	518.664	<u>144.088</u>
<i>Juniperus oxycedrus</i>	3.000	<u>833</u>
<i>Tamarix spp.</i>	2.000	<u>556</u>
<b>TOTAL BIOMASA DISPONIBLE DENTRO DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO</b>		<b><u>145.477</u></b>

Tras este estudio se determina que la posibilidad de extracción de biomasa forestal en la Comunitat Valenciana es de 145.477 toneladas anuales sin tener en cuenta nudos y piñas por falta de datos para determinar las cantidades.

#### 4.2.2 Biomasa agrícola

La posibilidad que resulta de la biomasa agrícola residual es mucho mayor que la forestal, 800.000 toneladas/año respecto a 200.000 toneladas/año [1]. Esto se debe principalmente a que los árboles destinados al cultivo agrícola tienen una gestión constante y para mejorar su estado se podan y limpian todos los años a diferencia de aquellos árboles que se encuentran formando las masas forestales (que generalmente carecen de gestión).

Las comarcas que mayor producción de biomasa residual agrícola ofrecen son las que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Producción de BRA (Biomasa Residual Agrícola) por comarcas. Fuente: [1].

Comarcas	BRA (t/año)
<b>La Plana de Utiel-Requena</b>	122.498
<b>La Ribera Alta</b>	58.885
<b>El Baix Maestrat</b>	53.848
<b>Baix Segura</b>	47.243
<b>La Plana Alta</b>	44.521
<b>Vinalopó Mitjà</b>	42.988
<b>El Camp de Túria</b>	40.145

Destacando la comarca de La Plana de Utiel-Requena con la producción del 15 % del total de biomasa residual agrícola (122.498 t/año). En este caso esta producción se debe mayoritariamente a la poda

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

de la viña. Sin embargo, las 800.000 t/año de toda la Comunitat Valenciana, provienen de olivo, almendro, viña, cítricos y cáscara de almendra.

Conocida la producción de BRA de cada una de las comarcas, se debe averiguar cuál es la producción total por especie agrícola.

Tabla 4. Coeficiente de producción de restos agrícolas anualmente. Fuente: [1].

Tipo de cultivo	Coeficiente de producción de restos (t/ha). Humedad 0%
Olivo	1,25
Almendro	1,7
Viña	2,14
Cítricos	1,7
Cáscara de almendra	0,075

Aunque hay varias especies agrícolas que producen BRA (Biomasa Residual Agrícola), en este caso hay que marcar la atención solamente en aquellas dos que se estudian anteriormente para la extracción de compuestos químicos.

Esas dos especies son el olivo y los cítricos (por el naranjo), sin embargo, este coeficiente hace referencia a la biomasa producida por la poda. Por tanto, como lo que se obtiene del naranjo es la cáscara del fruto (la naranja), estos valores no hacen referencia a dicha cáscara.

Entonces, la única cantidad de biomasa por especie agrícola que se puede calcular con los datos disponibles es la del olivo, conociendo el coeficiente de producción de restos y la superficie que ocupa dicha especie (93.953 ha [4], se obtiene la producción total en toneladas.

Tabla 5. Cálculo de la producción de biomasa residual agrícola del olivo. Fuente: AIDIMME.

	SUPERFICIE (ha)	COEFICIENTE DE PRODUCCIÓN DE RESTOS (toneladas/ha/año)	PRODUCCIÓN DE BIOMASA RESIDUAL AGRÍCOLA EN LA COMUNITAT VALENCIANA (toneladas/año)
<i>Olea europaea</i> (Olivo)	93.953	1,25	<u>117.441</u>

Por tanto, gracias al cálculo realizado se observa que la posibilidad de aprovechamiento de la biomasa del olivo en la Comunitat Valenciana es muy grande y de esa producción (117.441 t/año) se puede obtener gran cantidad de compuestos químicos.

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

### 4.3 Estudio preliminar de compuestos químicos presentes en los residuos seleccionados.

#### 4.3.1 Origen forestal

- *Pinus halepensis*

Se trata de un pino que contiene bastante resina y que podría ser una biomasa interesante. Los nudos son aquellas partes con más resinas y por tanto con mayor potencial de tener compuestos que le confieren a esta parte del árbol de la resistencia a xylofagos. Las ramas y hojas, como parte más verde del árbol y como biomasa más disponible también pueden ser de interés tanto por la resina como por otros compuestos.

En la bibliografía no hay estudios concretos y específicos sobre *Pinus halepensis*, aunque sí sobre la madera y nudos de otros pinos, como el *P. sylvestris*, *P. pinaster* o *P. nigra*, donde se encuentran compuestos como la pinosilvina, que tiene un interés como sustancia biocida.

- *Pinus sylvestris*

Como se ha comentado anteriormente esta especie contiene pinosilvina, seguramente entre otras sustancias que se encuentra principalmente en los nudos y el duramen del árbol. Distintos trabajos han estudiado la sustancia y su extracción a nivel internacional.

- *Pinus pinea*

Las piñas del pino piñonero permanecen sin deteriorarse durante mucho tiempo por lo que es un residuo de la obtención del piñón que podría ser fuente de productos químicos de interés como demuestran algunas investigaciones con conos o piñas de otras especies de pino.

- *Juniperus oxycedrus*

El enebro se ha utilizado desde antaño para la obtención de la miera, de donde se obtienen diversidad de compuestos utilizados en la industria química y cosmética. La madera es bastante resistente a los xilófagos, permaneciendo durante años a la intemperie sin que los xilófagos la ataquen, por lo que su análisis puede dar lugar a diversidad de compuestos para su uso en la industria de la madera como algunos estudios demuestran.

- *Tamarix sp.*

El Tamarix es una especie que como se ha comentado anteriormente vive en riberas y cauces, y según algunas referencias posee en su madera y corteza distintos compuestos químicos de interés. Es una especie que resiste muy bien la humedad e incluso es capaz de tener raíces a 30 m de profundidad. Distintos trabajos han estudiado la composición química y su posible interés en distintas disciplinas.

#### 4.3.2 Origen agrícola

- *Olea europea*

Del olivo se van a estudiar dos tipologías de biomasa de interés, para poder observar si hay



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

diferencias significativas entre la parte más verde y la madera antigua. Tanto la madera antigua como la joven son bastante resistentes al ataque de xilófagos, por lo que es probable que existan compuestos que inhiben las degradaciones de la madera. Algunos estudios inciden en los componentes químicos de la madera de olivo.

- *Citrus sp.*

Del naranjo en este caso se va a estudiar como residuo agrícola o industrial la piel o cáscara de la naranja. Es un residuo que contiene muchos aceites esenciales y que por sus características puede contener biocidas de interés como demuestran algunos estudios.

**4.4 Recogida en monte y zonas agrícolas y tratamiento de la biomasa para su procesado.**

Una vez identificados los residuos biomásicos de origen forestal y agrícola, se procedió a su recogida en origen para posteriormente procesarlos en las instalaciones de AIDIMME.

**4.4.1 Nudos de *Pinus halepensis***

En el caso del *Pinus halepensis* (pino carrasco) la madera para la obtención de nudos se extrajo de una masa forestal del interior de la provincia de Valencia.

El objetivo fue seleccionar aquella madera que tenía un mayor número de nudos y así facilitar la extracción posterior en AIDIMME.

Finalmente, la madera se transformó en tablas y de éstas se eligieron aquellas que tenían mayor número de nudos para facilitar la extracción.



Figura 1. Tablas con nudos de pino carrasco.

**4.4.2 Ramas y hojas (restos de poda) de *Pinus halepensis***

Para la obtención de la biomasa verde del pino carrasco se buscó una masa forestal de dicha especie localizada en el centro de la Sierra de Espadán en Castellón.

En este caso, la biomasa que se necesitaba era la que resulta de una poda o limpieza que se realiza en el monte. Concretamente, en la masa de estudio se realizó una poda de varios pies de pino carrasco para mejorar la masa y evitar el peligro de incendio. Por lo que se utilizaron esos residuos

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

para la posterior extracción de los compuestos químicos en AIDIMME.

#### 4.4.3 Nudos de *Pinus sylvestris*

Para la extracción de nudos de *Pinus sylvestris* se localizó una masa en el interior de la provincia de Castellón que albergaba esta especie. Se seleccionaron en monte aquellos pinos que por su crecimiento y constitución presentaban mayor número de nudos y, por lo tanto, un mayor rendimiento en lo que a producción de nudos se refiere.

Una vez designados aquellos pinos con más nudos se cortaron y se extrajeron del interior del monte mediante tracción animal (mulos) hasta un lugar donde se pudiera recogerlos con un tractor adaptado al medio forestal. Este tractor transportó dichos pinos hasta una zona transitable para el camión autocargador que fue el encargado de llevarlos hasta su destino.

#### 4.4.4 Restos de piñas de *Pinus pinea*

En este caso la especie es el *Pinus pinea* y de ella se extrajeron los compuestos químicos procedentes de las piñas. Para conseguir dichas piñas se aprovecharon los ejemplares de esta especie que se encuentran en las instalaciones de AIDIMME.

Cuando las piñas están maduras, el pino se desprende de ellas y quedan en el suelo debajo del mismo. Es el momento de recogerlas fácilmente para proceder a la extracción de compuestos químicos.

#### 4.4.5 Ramas y hojas (restos de poda) y madera de *Olea europaea*

En una zona cercana al lugar de recolección de ramas y hojas de *Pinus halepensis* había también olivos que tienen uso agrícola. De estos ejemplares se obtuvieron tanto las ramas y hojas (restos de poda) como la madera de olivo, ya que se seleccionaron ramas verdes para el primer caso y ramas que ya estaban muertas para el segundo.

#### 4.4.6 Ramas y hojas (restos de poda) de *Juniperus oxycedrus*

En el caso de la biomasa verde de enebro fue más complicado encontrar una masa pura de dicha especie, sin embargo, para la extracción de los compuestos químicos no es necesario grandes cantidades. Por ello, en una zona cercana a la anterior (también en la Sierra de Espadán) de donde se recolectó el pino carrasco y el olivo, se encontraron varios pies de enebro de los que se obtuvo la biomasa.

Con el objetivo de no dañar los pies sino mejorarlos se procedió a podar las ramas más bajas de varios ejemplares consiguiendo de esta manera la biomasa necesaria y una mejora para la masa.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

#### 4.4.7 Ramas y hojas (restos de poda) de *Tamarix sp.*

El taray es una especie diferente, habita otro tipo de ecosistemas y suele aparecer en zonas de ribera donde existe humedad (al menos ocasionalmente). Por ese motivo, para recolectar biomasa de dicha especie se buscó en una ribera cercana a la zona de la Sierra de Espadán anteriormente comentada.

#### 4.4.8 Cáscaras de *Citrus sp.*

Para la obtención de las cáscaras de *Citrus sp.* (naranja) no fue necesario su recolección en campo ya que se aprovechó la piel de aquellas naranjas destinadas a la alimentación humana.

### 4.5 Procesado de la biomasa.

Una vez en las instalaciones de AIDIMME, el procedimiento no fue el mismo para los nudos, las ramas y hojas (restos de poda), las piñas, la madera o las cáscaras, por ello, se explican en apartados diferentes.

#### 4.5.1 Nudos

En el caso de los nudos, éstos se separan del tablón eliminando la mayor cantidad de madera posible de la que envuelve al mismo, pues se espera analizar solo aquellas sustancias del mismo nudo y no de toda la madera. Este proceso se llevó a cabo tanto para los nudos de *Pinus sylvestris* como para *Pinus halepensis* a partir de las tablas y listones escogidos en el apartado anterior.

Con los nudos separados del resto de madera se procedió a introducirlos en la trituradora para obtener el elemento triturado para la extracción de compuestos químicos.

#### 4.5.2 Ramas y hojas (restos de poda), madera y piñas

La biomasa que se trituró fue:

- Ramas y hojas (restos de poda) de *Pinus halepensis*.
- Restos de piñas de *Pinus pinea*.
- Ramas y hojas (restos de poda) y madera de *Olea europaea*.
- Ramas y hojas (restos de poda) de *Juniperus oxycedrus*.
- Ramas y hojas (restos de poda) de *Tamarix sp.*

El procesado de la biomasa comenzó tras cortarla en pequeño tamaño para que fuera admisible para la máquina trituradora, con una sierra o con la motosierra.

Con la biomasa preparada en el tamaño adecuado se inició el triturado de cada una de las biomásas comentadas en el punto anterior.

La biomasa triturada se recogió por la parte inferior de la trituradora.

El resultado final fue la biomasa triturada diferenciando cada uno de los tipos posibles comentados



“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

anteriormente.



Figura 2. Ejemplo de las biomásas de olivo trituradas

#### 4.5.3 Cáscaras

En el caso de las cáscaras como no se requiere el triturado ya no necesita ningún tratamiento más para extraer los compuestos químicos. Pues se desmenuzó en trozos pequeños a mano y se secó, siendo con ello suficiente.

### PAQUETE DE TRABAJO 5.- DESARROLLO, ADAPTACIÓN Y APLICACIÓN DE LOS PROCESOS EXTRACTIVOS A NIVEL DE LABORATORIO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS.

Tal y como se ha comentado en el paquete de trabajo 4, el uso de residuos de biomasa forestal y de la agricultura, para producir materiales respetuosos con el medio ambiente y de alto valor añadido, constituye una atractiva solución de gestión de residuos desde una perspectiva de obtención de productos químicos, que contribuye a una economía futura sostenible. Además de poder dar una nueva salida más respetuosa a este tipo de residuos, que su utilización con fines energéticos.

En este sentido en el paquete de trabajo 4 se ha investigado en las distintas biomásas existentes en la Comunitat Valenciana que son de interés ya sea por ser un residuo que no tiene uso, su cantidad o por su posible interés como fuente de compuestos químicos.

A partir de estos estudios, se han seleccionado, recogido y procesado biomásas tanto de origen forestal como agrícola de diferentes especies.

En el paquete de trabajo 5, se han realizado, para cada especie y muestra recogida, en primer lugar, estudios de los procesos extractivos más adecuados para la obtención de los productos con las actividades requeridas. A partir de esos estudios se han desarrollado, adaptado y aplicado dichos procesos y se han obtenido y analizado, desde un punto de vista químico, los extractos obtenidos.

Los objetivos específicos se han centrado en:

1. Realización de diferentes procesos de extracción de sustancias en los residuos recogidos.
2. Caracterización de los extractos e identificación de sustancias obtenidas (GC-MS), semi-cuantificación del rendimiento y estudio bibliográfico de la actividad de los compuestos identificados

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

en los campos relacionados con el proyecto.

3. Purificación por cromatografía de columna en un extracto en concreto, el EXHID-3.

### **5.1 Extracción sólido-líquido. Métodos y equipamiento empleados.**

En la actualidad existen numerosas técnicas de extracción de compuestos de interés presentes en residuos biomásicos, siendo las más extendidas la extracción sólido-líquido, concretamente, las técnicas de extracción Soxhlet y maceración. Estas técnicas están basadas en la transferencia de masa entre el disolvente de extracción y la biomasa sólida, con o sin agitación y temperatura. Estas técnicas son sencillas de realizar, pero comparado con otras técnicas emergentes, requieren del empleo de mayor cantidad de disolvente y mayores periodos de extracción. Mediante estas técnicas, se consigue la extracción y aislamiento de compuestos, los cuales presentan actividades antimicrobianas, fungicidas y otras propiedades de interés.

La técnica de extracción sólido-líquido se basa en una operación básica de recuperación o extracción, mediante la cual, uno o varios componentes de una fase sólida, se transfieren a la fase líquida. En este método es necesaria la utilización de un disolvente activo o inerte (fase líquida) para llevar a cabo la separación selectiva de un compuesto presente en el residuo biomásico (fase sólida). El sentido de la transferencia siempre es desde la fase sólida hacia la fase líquida, donde, en primer lugar, tiene lugar la difusión del soluto a través del disolvente desde los poros del sólido hasta la interfase, y posteriormente, la transferencia del soluto desde la superficie de las partículas del sólido al seno del líquido. Transcurrido el tiempo establecido para que se alcance el equilibrio entre ambas fases, se procede a la separación de la parte sólida (impregnada de la parte líquida) de la parte líquida, con los componentes de interés, conocida como extracto.

Un factor interesante a evaluar en el proceso es la eficacia y el rendimiento de extracción. Estos factores dependen en su mayoría del disolvente utilizado para la extracción, que debe tener una diferencia de solubilidad entre el compuesto deseado a extraer y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial. Otras propiedades a tener en cuenta son la volatilidad y toxicidad de los posibles disolventes a utilizar. En el presente proyecto la extracción de componentes de interés se llevó a cabo mediante disolventes inertes de baja toxicidad.

Los métodos de extracción sólido-líquido a nivel de laboratorio empleados en el presente proyecto han sido:

- Extracción mediante técnica Soxhlet.
- Extracción mediante técnica maceración.

#### **5.1.1 Extracción mediante técnica Soxhlet.**

Para la obtención del material extraíble mediante el uso de disolventes por el método Soxhlet, han sido empleados dos equipos de laboratorio diferentes, el montaje de vidrio tradicional Soxhlet y la unidad automatizada de extracción Soxtec™ 8000.



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- Extracción tradicional con montaje Soxhlet.

El montaje de laboratorio Soxhlet consta de una serie de instrumentos fijados mediante soportes y abrazaderas, de abajo a arriba se observa una manta calefactora, un matraz de fondo redondo, el extractor Soxhlet, cartucho de celulosa, serpentín de refrigeración y tubos de goma necesarios para conectar el condensador con el agua de refrigeración. Mediante este procedimiento, la muestra sólida triturada es colocada en el cartucho de celulosa, de material poroso, que es situado en la cámara del extractor Soxhlet. El disolvente de extracción es colocado en el matraz de destilación de fondo redondo, donde es calentado por la manta calefactora. Los vapores del disolvente ascienden por el montaje hasta llegar al serpentín de refrigeración, donde condensa y cae gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra, teniendo lugar la extracción de las sustancias de interés. El disolvente junto con las sustancias extraídas es acumulado en un compartimento lateral que presenta el extractor Soxhlet. Cuando el nivel del disolvente condensado recogido en el compartimento alcanza la parte superior del sifón lateral, retorna al matraz de ebullición. Este proceso es repetido varias veces hasta que la extracción de las sustancias ha tenido lugar.



Figura 3. Montaje de laboratorio Soxhlet.

- Extracción con unidad Soxtec™ 8000.

La unidad de extracción Soxtec™ 8000 es un instrumento automatizado para la determinación de materia extraíble con disolventes, el cual consta de una unidad de control, situada en la parte superior, con la que se programan las variables del proceso, una unidad de extracción formada por seis posiciones de extracción en serie, y conectada a ésta, un baño de refrigeración.



Figura 4. Unidad de extracción Soxtec™ 8000 y baño de refrigeración.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

Mediante este procedimiento, la muestra sólida triturada es introducida en los cartuchos de celulosa, colocados mediante el empleo de capuchones, en las distintas posiciones del equipo. El disolvente de extracción es colocado en los vasos de extracción, que será calentado por placas calefactores situadas en la unidad de extracción. Se programan las variables en la unidad de control y se inicia el proceso. Las tres etapas posteriores, etapa de ebullición, etapa de goteo o condensado y etapa de recuperación, están totalmente automatizadas. El equipo calienta el disolvente hasta la temperatura de proceso programada, momento en que se inicia la primera etapa de ebullición. En esta etapa, los cartuchos con las muestras son sumergidos en el disolvente hirviendo, extrayendo la mayor parte de la materia extraíble. Finalizado el tiempo programado para la primera etapa, se inicia la segunda etapa de goteo o condensado, donde los cartuchos junto con las muestras se elevan por encima del nivel del disolvente. Los vapores de disolvente ascienden por el montaje hasta el serpentín de refrigeración, donde condensa y caen gota a gota sobre el cartucho de celulosa que contiene la muestra, arrastrando las sustancias extraídas de la muestra y retornando finalmente al vaso de extracción. Este proceso es repetido varias veces hasta la finalización del tiempo programado para esta etapa. Finalizada la etapa de condensado, se inicia la tercera etapa de recuperación, donde el disolvente es evaporado y recuperado en un matraz, dejando la materia extraíble más concentrada en la cubeta. Durante los últimos minutos de la recuperación se suministra flujo de aire en cada posición para mejorar la recuperación de disolventes.

Comparando ambos procedimientos, mediante el montaje tradicional de vidrio Soxhlet, la extracción tiene lugar únicamente en la etapa de goteo del condensado del disolvente sobre el cartucho que contiene la muestra. En cambio, mediante el empleo del equipo automatizado Soxtec™ 8000, la extracción tiene lugar en la primera etapa de ebullición, en la cual, el cartucho se sumerge totalmente en el disolvente, y en la segunda etapa de goteo o condensado. Además, mediante el empleo del equipo automatizado Soxtec™ 8000 se consigue disminuir los tiempos de extracción, obtener una mayor cantidad de extracto concentrado final, debido a las seis posiciones en serie, y la posibilidad de recuperar parte del disolvente en el mismo montaje de extracción, pudiendo ser reutilizado en posteriores extracciones.

#### 5.1.2. Extracción mediante técnica maceración.

La técnica de extracción por maceración es la técnica más convencional de extracción sólido-líquido en la obtención de bioproductos de interés presentes en vegetales, y se caracteriza por ser la más económica. Esta técnica consiste en mezclar la muestra sólida y disolvente en un recipiente y dejar en contacto durante un tiempo determinado para que tenga lugar la transferencia del soluto de interés en el seno del disolvente (Figura 5). Este proceso puede tener lugar a temperatura y bajo agitación, facilitando con ello la extracción. Finalizado el tiempo de extracción, las impurezas presentes en el extracto son eliminadas mediante filtración.

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción



Figura 5. Proceso de extracción por maceración.

5.1.3. Resultados obtenidos con las extracciones.

A continuación, se muestra una tabla resumen con todos los resultados obtenidos con los distintos residuos biomásicos estudiados, indicando el nombre que se le ha dado a cada extracto, la especie y la parte de la planta de la que proviene, el método de extracción empleado, así como el disolvente y el rendimiento de extracto obtenido.

Tabla 6: Extracciones y extractos obtenidos a partir de la biomasa recogida en el proyecto.

EXTRACTO	ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	DISOLVENTE	RTO. (%)
EXHID-1	<i>Pinus halepensis</i>	Nudos	Montaje Soxhlet	Acetona	-
EXLIP-1	<i>Pinus halepensis</i>	Nudos	Soxtec™8000	Hexano	-
EXHID-2	<i>Pinus halepensis</i>	Nudos	Soxtec™8000	Acetona	-
EXHID-3	<i>Pinus halepensis</i>	Nudos	Soxtec™8000	Acetona	18,37
EXHID-4	<i>Pinus halepensis</i>	Ramas y hojas	Soxtec™8000	Acetona	8,6
EXHID-5	<i>Pinus pinea</i>	Piñas	Soxtec™8000	Acetona	4,34
EXHID-6	<i>Olea europaea</i>	Madera seca	Maceración	Etanol:Agua (50:50)	100,35
EXHID-7	<i>Olea europaea</i>	Madera seca	Soxtec™8000	Etanol	10,57
EXHID-8	<i>Olea europaea</i>	Ramas y hojas	Maceración	Etanol	8,15

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

<b>EXHID-9</b>	<i>Olea europaea</i>	Ramas y hojas	Soxtec™8000	Etanol	14,11
<b>EXHID-10</b>	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Restos de poda	Soxtec™8000	Acetona	5,12
<b>EXHID-11</b>	<i>Tamarix sp.</i>	Restos de poda	Soxtec™8000	Etanol	5,91
<b>EXLIP-2</b>	<i>Citrus sp.</i>	Cáscaras	Soxtec™8000	Hexano	1,47
<b>EXHID-12</b>	<i>Citrus sp.</i>	Cáscaras	Soxtec™8000	Acetona	4,93
<b>EXHID-13</b>	<i>Pinus sylvestris</i>	Nudos	Soxtec™8000	Acetona	31,3

Cabe destacar de la Tabla 6, que en los primeros extractos no se calculó el rendimiento, ya que se consideraron pruebas preliminares. También se debe señalar que el rendimiento obtenido con el extracto EXHID-6 no fue correcto, ya que se obtuvo un resultado mayor del 100% debido a la presencia de disolvente que no se logró evaporar.

- Purificación de compuestos en EXHID-3.

El extracto EXHID-3 se purificó con la finalidad de aislar la sustancia biocida pinosilvina. La separación de compuestos se realizó mediante la técnica de cromatografía en columna flash con gradiente de la fase móvil, empezando con ciclohexano al 100 % y terminando con acetato de etilo al 100 %. La identificación de los compuestos se realizó por cromatografía de placa fina (TLC) y cromatografía de gases-masas.

A partir de la separación por cromatografía flash se recogen cuatro diferentes submuestras, las cuales resultan de la unión y posterior concentración de las fracciones obtenidas tras la columna que poseen compuestos de interés. Dichos compuestos se detectaron por Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS) de las diferentes fracciones. De esta manera se obtuvieron las siguientes submuestras:

EXHID-3-1: Fracción 01-06

En la fracción 01 – 06, el compuesto de interés fue el limoneno, el cual ha demostrado tener efectos fungicidas y antibacterianos. El rendimiento fue del 3,58 %.

EXHID-3-2: Fracción 7-18

El principal componente que contenían las fracciones de la 7 a la 18 fue la vainilla, que según la bibliografía tiene propiedades herbicidas. El rendimiento fue del 0,715 %.

EXHID-3-3: Fracción 19-33

Tal como se ha comentado anteriormente, la pinosilvina es el principal compuesto de interés. Ésta se encontraba entre los viales extraídos de la columna cromatográfica 19 y 33. El rendimiento fue del 0.17 %

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

EXHID-3-4: Fracción 34 – 65

En estas fracciones no apareció ningún compuesto de interés en la cromatografía de gases. De hecho, en estas fracciones aparecían pocos compuestos en comparación con las primeras fracciones, lo cual indica que el extracto de *Pinus halepensis* tiene más compuestos apolares que polares. Aun así, se unieron y se calculó el rendimiento, que fue del 0,13 %.

5.1.4. Caracterización de los extractos.

Los extractos obtenidos se han analizado usando la técnica de cromatografía CG-MS (en primeras pruebas se utilizó el cromatógrafo modelo Agilent 7820A GC - 5977B MSD y con las demás el modelo Intuvo 9000GC-7000D GC/TQ). La columna empleada fue una columna no-polar HP-5MS y el gas portador Helio, con un caudal de 1,2 ml/min. La temperatura de inyección fue de 250°C. La temperatura del horno inicialmente fue de 40°C aumentando gradualmente 10°C/min hasta alcanzar una temperatura de 300 °C. Para su inyección en cromatógrafo, los extractos concentrados son diluidos con disolvente de grado analítico para poder obtener cromatogramas más limpios, siendo así más fácil la identificación de las sustancias mayoritarias presentes.

A continuación, se muestra una tabla resumen para cada extracto, donde se indican los compuestos más abundantes obtenidos en cada uno y sus propiedades de interés.

- EXHID-1

**Tabla 7: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-1.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
5,09	2,4,6-octatrieno, 2,6-dimetil-, (E,E)-	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antioxidante [5]
12,18	Cariofileno	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Antibacteriano, antifúngico [6] [7]
21,41	Ácido isopimárico	Diterpeno	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Antimicrobiano, fungicida [8] [9]
21,89	Pinosilvina	Estilbenoide	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano, fungicida [10] [11]
22,99	Ácido abiético	Diterpeno	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano, fungicida [8] [12] [9]

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- EXLIP-1

**Tabla 8: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXLIP-1.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
5,08	Triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano,1,3,3-trimetil	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antimicrobiano [13]
12,19	Cariofileno	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Antibacteriano, antifúngico [6] [7]
23,11	Ácido abiético	Diterpeno	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano, fungicida [8] [12] [9]

- EXHID-2

**Tabla 9: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-2.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
5,08	Triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano,1,3,3-trimetil	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antimicrobiano [13]
21,37	Acridin-9-amina, 1,2,3,4-tetrahidro-5,8-dimetil-	Compuesto nitrogenado	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	Termiticida, protozoicida [14]
23,25	Ácido palústrico	Diterpeno	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano [15]
23,25	Ácido abiético	Diterpeno	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano, fungicida [8] [12] [9]

- EXHID-3

**Tabla 10: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-3.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
5,10	Triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano, 1,3,3-trimetil-	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antimicrobiano [13]
12,25	Cariofileno	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Antibacteriano, antifúngico [6] [7]
13,23	alfa.-Muuroleno	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Insecticida [16]
21,58	9H-pirido[3,4-b]indol, 7-metoxi-1,9-dimetil-	Compuesto nitrogenado	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	Antibacteriano [17]
22,27	Pinosilvina	Estilbenoide	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano, fungicida [10] [11]

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- EXHID-4

**Tabla 11: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-4.**

Tiempo retención (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
12,22	Cariofileno	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Antibacteriano, antifúngico [6] [7]
19,23	Thunbergol	Alcohol diterpénico	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O	Antimicrobiana [18]

- EXHID-5

**Tabla 12: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-5.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
6,51	D-limoneno	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antifúngico, antibacteriano, antioxidante, antivirídica [19] [20] [21]
14,28	Óxido de cariofileno	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Antimicrobiano, antifúngico [22, 23].
21,77	Deshidroabietato de metilo	Ácido resinoso	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Antimicrobiano, antifúngico [24].

- EXHID-6

**Tabla 13: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-6.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
12,31	4-hidroxi-bencenoetanol	Fenol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	Antioxidante, antimicrobiano [25, 26, 27]
15,97	(E)-4-(3-hidroxi-prop-1-en-1-il)-2-metoxifenol	Fenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	Antimicrobiano [28]

- EXHID-7

Resultados muy similares a los obtenidos con el extracto EXHID-6.



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- EXHID-8

**Tabla 14: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-8.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
5,99	n-Decano	Alcano	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	Antimicrobiano [29]
25,72	Heneicosano	Alcano	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	Antimicrobiano [30]
27,17	Hexacosano	Alcano	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	Antimicrobiano [31] [32]

- EXHID-9

**Tabla 15: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-9.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
15,98	(E)-4-(3-hidroxi-prop-1-en-1-il)-2-metoxifenol	Fenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	Antimicrobiano [28]
27,18	Tetratriacontano	Alcano	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>	Antibacteriano, antifúngico [33] [34] [35]

- EXHID-10

**Tabla 16: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-10.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
13,14	4-epi-cubebol	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	Antibacteriano [36]
13,41	cubebol	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	Antibacteriano [36]
14,77	Di-epi-1,10-cubenol	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	Antibacteriano [37]
14,93	epicubenol	Sesquiterpeno	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	Antibacteriano [37]

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- EXHID-11

**Tabla 17: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-11.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
15,65	3,5-dimetoxi-4-hidroxibencílico	Metoxifenol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Antioxidante, antibacteriano, resistencia UV [38] [39].
15,82	3,5-dimetoxi-4-hidroxibencenoetanol	Metoxifenol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Antioxidante, antibacteriano, resistencia UV [38] [39].
26,48	Gamma-sitostenona	Esterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	Antimicrobiano, antifúngico, antituberculosis [40] [41].

- EXLIP-2

**Tabla 18: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXLIP-2.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
5,89	β-mirceno	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antimicrobiano [42]
7,57	Linalool	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	Antimicrobiano [42]
9,13	Decanal	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	Antimicrobiano [42]
9,67	Neral	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	Antibacteriano [43]
25,29	Escualeno	Triterpeno	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	Antioxidante, cardioprotectora, antitóxica [44]

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- EXHID-12

**Tabla 19: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-12.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
5,89	β-mirceno	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antimicrobiano [42]
6,51	D-limoneno	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antibacteriano, antifúngico, viricida, antioxidante, quimiopreventivo, anticancerígeno, antidiabético [45] [46] [42] [47]
7,58	Linalool	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	Antimicrobiano [42]
9,00	α-terpineol	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	Antioxidante e insecticida [42]
9,13	Decanal	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	Antimicrobiano [42]
13,59	N- metilvaleramida	Acilo graso	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO	Antimicrobiano [48]
13,59	2-(hidroximetil)-2-nitro-1,3-propanodiol	Compuesto nitrogenado	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	Antimicrobiano [48]
13,96	4-etenil-2,6-dimetoxifenol,	Estilbeno	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	Antioxidante y antimutagénico [49]
25,29	Escualeno	Triterpeno	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	Antioxidante, cardioprotectora, antitóxica [44]

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- EXHID-13

**Tabla 20: Propiedades de compuestos más abundantes identificados en EXHID-13.**

TR (min)	Compuesto	Clasificación	Fórmula	Propiedades
4,79	(1R)-2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno	Monoterpeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Antibacteriano, antifúngico, insecticida [50] [51] [52]
19,03	Pinosilvina	Estilbenoide	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano, fungicida [53] [11]
20,80	9H-pirido[3,4-b]indol, 7-metoxi-1,9-dimetil-	Compuesto nitrogenado	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	Antibacteriano [17]
22,72	Ácido abiético	Diterpeno	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Antibacteriano, fungicida [54] [55] [9]

**PAQUETE DE TRABAJO 6.- CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS PARA SUSTRATOS DEL SECTOR MADERA, MUEBLE Y CONSTRUCCIÓN.**

Durante la realización del Paquete de Trabajo 5, se obtuvieron diferentes extractos provenientes de las muestras de biomasa recogidas y procesadas durante el desarrollo del Paquete de Trabajo 4.

En este sentido, uno de los objetivos del paquete de trabajo 6, fue la caracterización y validación de propiedades de interés de dichos extractos para la industria y, en especial, para el sector madera, mueble y construcción (biocida, hidrofobicidad y resistencia al fuego).

El segundo de los principales objetivos de este paquete de trabajo viene dado por el interés en encontrar metodologías de obtención de bioproductos alternativas a las extracciones, así como por el auge de los procesos termoquímicos en la actualidad. Es por ello, que el segundo objetivo consistió en realizar una prospección de dichos procesos y seleccionar el más adecuados para la revalorización. Durante este estudio se seleccionó la técnica de Carbonización Hidrotermal, y se llevó a cabo diferentes análisis a nivel de laboratorio, contando con la subcontratación del ITQ (Instituto de Tecnología Química) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

En primer lugar, se resume la prospección de los procesos termoquímicos y los resultados obtenidos con la Carbonización Hidrotermal de los residuos biomásicos seleccionados. Seguidamente, se resumen los resultados de las caracterizaciones de todos los extractos obtenidos, tanto los obtenidos en el paquete de trabajo 5, como de los bioproductos conseguidos procedentes de la parte líquida extraída en la Carbonización Hidrotermal durante la realización del presente paquete de trabajo 6.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción****6.1 Procesos termoquímicos para la revalorización de residuos biomásicos**

Los tratamientos termoquímicos son procesos en los que una cantidad de biomasa se somete a unas determinadas condiciones de presión y temperatura que provocan en ella distintas transformaciones químicas. El producto final obtenido es un sólido similar al carbón, además de una fracción líquida y una porción de gases no condensables. Entre las técnicas termoquímicas destacan la pirolisis y la carbonización hidrotermal. La particularidad de la pirolisis es que la biomasa se calienta en ausencia de oxígeno para evitar su combustión, mientras que en carbonización hidrotermal, se calienta la biomasa sumergida en agua a altas presiones. Ambas se emplean habitualmente para obtener materia carbonizada que se destina principalmente a la obtención de energía. Sin embargo, recientemente se están haciendo esfuerzos para diversificar el producto obtenido, por ejemplo, empleando la fracción líquida en los casos en los que presenta propiedades de interés u obteniendo nanomateriales formados por átomos de carbono ordenados. Todo esto se puede conseguir mediante una adecuada elección de los parámetros de los procesos termoquímicos. Precisamente, el obtener de un mismo proceso más de un tipo de sustancia revalorizada es una de las principales ventajas que pueden ofrecer estas técnicas. Otra ventaja es que, a diferencia de la mayoría de las técnicas de extracción, no se emplean disolventes, con lo cual en ese sentido son más respetuosos con el medio ambiente y además son procesos fácilmente escalables, permitiendo trasladar el proceso de revalorización a la industria.

Se ha demostrado que tanto la carbonización hidrotermal como la pirolisis pueden generar productos más allá del biocarbón como lo son los aceites con propiedades de interés o las nanoestructuras de carbono. En general, los aceites de pirolisis están más estudiados que los de carbonización hidrotermal, sin embargo, hay algunos indicios de que el producto obtenido por carbonización hidrotermal podría tener mejores propiedades. En este último caso, las moléculas grandes contenidas en la biomasa quedan disueltas en el agua en la que se lleva a cabo la reacción, a diferencia de la pirolisis, en cuyo caso las estructuras moleculares se degradan. La conservación de estas moléculas hace posible que se mantengan algunas de las propiedades de interés. Así, este proceso se presenta como una buena solución para transferir algunas propiedades presentes en la biomasa a distintos productos con la mínima alteración. Otra de las ventajas que presenta es que hace posible tratar materia húmeda, mientras que en pirolisis es necesario un tratamiento previo de secado que incrementaría los costes o directamente muchos tipos de biomasa quedarían descartados. Aunque existen pocos estudios publicados al respecto, muestran resultados muy prometedores. Por ejemplo, se ha extraído limoneno a partir de cáscaras de naranja por carbonización hidrotermal, que presenta efecto bactericida [56]. Dicha extracción sería inviable en pirolisis debido al alto contenido en agua de las cáscaras de naranja. Por esta razón, los aceites obtenidos por carbonización hidrotermal son un campo a explorar para revalorizar biomasa residual forestal como productos de alto valor añadido para aplicarlos en el sector de la madera, el mueble y la construcción. Y es por ello que se seleccionó como metodología en investigación en el proyecto AGROFOREF.

Además, durante el proyecto, los extractos de residuos biomásicos se han obtenido por extracciones con disolventes (Soxhlet o maceración). En esta etapa del proyecto se planteó realizar una investigación aplicando la metodología de la carbonización hidrotermal en algunos de los residuos estudiados en el paquete de trabajo 5 para conseguir, también, otros bioproductos obtenidos de forma alternativa a las extracciones clásicas. De esta manera, se utilizó la fase líquida que se obtuvo por HTC como bioproducto en estudio, con el fin de estudiarla y de utilizar una fase que normalmente se desecha o no se considera, ya que habitualmente se utiliza la fase sólida o



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

hidrochar, contribuyendo a la economía circular, con el aprovechamiento de todas las fases resultantes.

**6.1.1 Extracción de aceites esenciales mediante el proceso de carbonización hidrotermal**

El estudio de la extracción de aceites esenciales a partir de biomasa durante el proceso de carbonización hidrotermal se realizó con la participación del Instituto de Tecnologías Químicas (ITQ) de la Universitat Politècnica de València y bajo la coordinación del Dr. Michael Renz.

Se eligieron 2 de los residuos biomásicos estudiados en el proyecto para realizar el estudio. Éstos fueron:

- Residuos de cáscaras de naranja de la especie *Citrus sp.* Al extracto obtenido se le designó como HTC-1.
- Residuos de restos de poda, ramas y hojas, de la especie *Olea europaea*. Al extracto obtenido se le designó como HTC-2.

El proceso de extracción de aceites esenciales a partir de biomasa durante el proceso de carbonización hidrotermal se conoce a escala piloto industrial [56], pero hasta ahora no se había simulado en el laboratorio. Para ello se adaptó un autoclave y se comprobó el aparato con una mezcla de agua/limoneno y con piel de naranja en agua (Figura 6). Con esta adaptación se realizaron las HTC de las cáscaras de naranja (HTC-1) y los restos de poda de olivo (HTC-2) en las mismas condiciones.

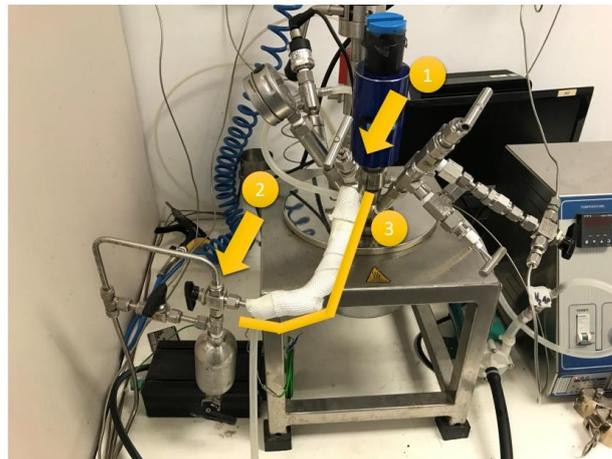


Figura 6: Autoclave con adaptación para la extracción de monoterpenos.

- HTC-1

Una vez se habían establecido las condiciones de reacción y la funcionalidad del reactor se empleó piel de naranja para la extracción del limoneno directamente a partir de biomasa. Para ello, se cargó el autoclave con 48 g de piel de naranja triturada (76 % de humedad; resultaron 37 g de agua y 12 g de masa seca) y 2 g de tolueno. Se calentó a 220 °C y se sacaron pequeñas cantidades de muestra en forma de vapor que condensó en el tubo enfriado.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

Una vez terminada la extracción de vapores del autoclave, se abrió el reactor y se recuperó residuo de naranja como hydrochar húmedo. No hubo fase líquida que se pudiese haber separado por filtración. Por esto, se secó el sólido y se determinaron cantidad y composición de las cenizas.

La diferencia en el peso antes y después del secado se incluyó en el balance de masa como líquido. El rendimiento al sólido fue del 35%, con un porcentaje de carbono del 66,4%.

La cantidad de monoterpenos fue destacable en tres fracciones de las fracciones obtenidas, las fracciones cuatro, cinco y seis.

Una vez detectada una cantidad significativa de monoterpenos, la extracción se completó en un tiempo relativamente corto, de aproximadamente 20 min. En las fracciones posteriores, siete a diez, se eliminó la cantidad residual de monoterpeno del reactor.

En el análisis cromatográfico de la parte orgánica de las extracciones de vapor a partir de la cáscara de naranja se detectaron, a parte del limoneno, otros tres monoterpenos, el alfa-terpineno, el gama-terpineno y el terpinoleno. En las primeras cuatro extracciones la selectividad al limoneno bajó sucesivamente del 77% al 72% y quedó constante después con aproximadamente el 70%. El segundo isómero más abundante fue el terpinoleno con un 17%, mientras que el alfa- y el gamaterpineno se encontraron en un 8% y un 5%, respectivamente.

Estas fracciones se unieron y esta unión se corresponde con la muestra HTC-1

- HTC-2

Una vez adaptado el autoclave para la extracción de compuestos orgánicos durante la reacción de carbonización hidrotermal, se estudió la transformación de restos de poda de olivo y una posible extracción de compuestos orgánicos en el medio vapor.

Se realizaron tres réplicas, utilizándose 8.0 g de biomasa y 30 g de agua de media. También se introdujo tolueno (2.0 g) en el autoclave para facilitar la destilación de componentes orgánicos. En el balance global se recuperó un 85% en peso del material empleado. El rendimiento al sólido fue un 52–53% en peso de la materia seca empleada, con un 65.3% de contenido en carbono. Estos valores demuestran que se trata de un carburante sólido renovable de alta cantidad.

Con respecto a las extracciones de vapor de agua, al principio se extrajo una cantidad menor hasta llegar a una cantidad constante de entre 3.0 y 3.5 g.

En los cromatogramas se encontraron varios compuestos del grupo de sesquiterpenos. Sin embargo, por la baja concentración la identificación no fue inequívoca. Aparte de los sesquiterpenos también se detectó un grupo de compuestos que se determinó pesados. Por la baja concentración no se pudieron identificar estos compuestos de manera inequívoca. Probablemente incluyen derivados de ácidos grasos y diterpenos.

En conclusión, se pudo constatar que de los restos de poda de olivo se pueden obtener compuestos diferentes que en el caso de la cáscara de naranja. Sin embargo, la cantidad es muy baja. A nivel industrial se podría generar gramos de este material lo que valdría la pena si se tratara de compuestos de un alto valor añadido. Para ello la tercera réplica realizada, que no tenía



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

contaminación con los terpenos de la cáscara de naranja, se estudió como la muestra HTC-2 y se evaluaron sus propiedades para poder determinar el valor que puede tener este bioproducto.

**6.2 Caracterización y validación de los bioproductos en laboratorio**

A continuación, se resumen los resultados alcanzados con las caracterizaciones de todos los bioproductos obtenidos durante la realización del proyecto AGROFOREF, tanto de los extractos del paquete de trabajo 5, como de los bioproductos obtenidos en la Carbonización Hidrotermal, en este paquete de trabajo.

**6.2.1. Evaluación microbiológica de los bioproductos obtenidos**

Los extractos de nudos de *P. halepensis* referenciados como EXLIP-1 y EXHID-2 no fueron evaluados microbiológicamente. El extracto EXLIP-1, se realizó con la finalidad de obtener y separar sustancias lipofílicas de los nudos de *P. halepensis* para, posteriormente, en una segunda extracción, EXHID-2, reducir el número de sustancias que no eran de interés, obteniendo un extracto más purificado, en el que identificar y aislar la sustancia biocida pinosilvina. Tras análisis cromatográfico no se consiguió identificar esta sustancia en los extractos EXLIP-1 y EXHID-2. En cambio, en los extractos EXHID-1 y EXHID-3, también de nudos de *P. halepensis*, sí se identificó la pinosilvina en cantidades considerables, evaluando en esta muestra, por tanto, sus propiedades microbiológicas.

- Técnicas microbiológicas

Se han realizado dos técnicas de evaluación de la actividad microbiológica en función de las características de las muestras:

- Dispersión en discos (siembra en superficie o en profundidad) para halo de inhibición.
- Pocillos en siembra en profundidad para inhibición.

No obstante, y debido a la viscosidad y poca solubilidad de los extractos, la técnica más utilizada ha sido la de pocillos en siembra en profundidad para inhibición.

Las siguientes tablas muestran los resultados microbiológicos obtenidos con todos los extractos analizados.

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

- EXHID-1

Tabla 21: Resultados microbiológicos de EXHID-1 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	Hongos						Bacterias	
	<i>A. niger</i> 48h	<i>A. niger</i> 120h	<i>A. ver.</i> 48 h	<i>A. ver.</i> 120h	<i>A. pul.</i> 48h	<i>A. pul.</i> 120h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-1	0,7	0,9	0,5	0,7	0,7	0,7	2,8	-

- EXHID-3

Este bioproducto proviene de la extracción de nudos de *P. halepensis* realizada en una única fase utilizando como disolvente acetona de alto grado de pureza, y llevada a cabo en equipo de extracción Soxtec™ 8000.

Tal y como se explica en el paquete de trabajo 5, el extracto EXHID-3 se purificó con la finalidad de aislar la sustancia biocida pinosilvina, y otras sustancias de interés por sus posibles propiedades biocidas. La separación de compuestos se realizó mediante la técnica de cromatografía en columna flash.

A partir de los resultados de la cromatografía de gases, se agruparon determinadas fracciones obtenidas en la cromatografía en columna. De esta manera se obtuvieron cuatro submuestras procedentes de EXHID-3:

- EXHID-3-1, la cual proviene de la agrupación de las fracciones de la columna 01-06, en las que el compuesto de interés es el limoneno.
- EXHID-3-2, la cual proviene de la agrupación de las fracciones de la columna 07-18, en las que el compuesto de interés es la vainillina.
- EXHID-3-3, la cual proviene de la agrupación de las fracciones de la columna 19-33, en las que el compuesto de interés es la pinosilvina. Este extracto se analizó tanto sin diluir, utilizando la técnica de difusión en pocillos (EXHID-3-3a), como diluido en acetona (EXHID-3-3b), tanto utilizando la técnica de difusión en pocillos como la técnica de difusión en disco.
- EXHID-3-4, la cual proviene de la agrupación de las fracciones de la columna 34-65, en las que no aparece ningún compuesto de interés en la cromatografía de gases, no obstante, se recogen para su análisis.

Todas estas muestras se analizaron microbiológicamente y la Tabla 22 muestra sus resultados.

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

Tabla 22: Resultados microbiológicos de las submuestras de EXHID-3 mediante la técnica de difusión en pocillos y discos.

Muestra (halo cm)	Hongos				Bacterias	
	<i>A. niger</i> 48h	<i>A. niger</i> 120h	<i>Rh. stol.</i> 48 h	<i>Rh. stol.</i> 120h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-3-1	0,7	0,5	1,6	0,5	0,9	-
EXHID-3-2	-	-	-	-	-	-
EXHID-3-3a	-	-	0,3	0,2	-	-
EXHID-3-3b Acetona/pocillos	0,8	0,9	0,8	1,0	1,3	0,7
EXHID-3-3b Acetona/discos	-	-	-	-	1,4	-
EXHID-3-4	-	-	-	-	-	-

- EXHID-4

Tabla 23: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-4 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	Hongos				Bacterias	
	<i>A. niger</i> 48h	<i>A. niger</i> 120h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-4	-	-	-	-	-	-

- EXHID-5

Tabla 24: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-5 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	Hongos				Bacterias	
	<i>A. niger</i> 48h	<i>A. niger</i> 120h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-5	-	-	-	-	-	-

- EXHID-6

Tabla 25: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-6 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-6	-	-	0,2	0,0	0,7	0,7

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

- EXHID-7

Tabla 26: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-7 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-7	-	-	-	-	0,7	-

- EXHID-8

Tabla 27: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-8 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-8	0,9	0,4	-	-	0,6	-

- EXHID-9

Tabla 28: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-9 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-9	-	-	-	-	0,7	-

- EXHID-10

Tabla 29: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-10 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-10	-	-	0,5	-	1,2	-

- EXHID-11

Tabla 30: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-11 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-11	0,8	-	0,5	-	1,6	2,2

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

- EXLIP-2

Tabla 31: Resultados microbiológicos de la muestra EXLIP-2 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXLIP-2	0,5	-	-	-	0,7	-

- EXHID-12

Tabla 32: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-12 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
EXHID-12	2,5	-	-	-	1,0	-

- EXHID-13

Tabla 33: Resultados microbiológicos de la muestra EXHID-13 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS						BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48h	<i>A. niger</i> 120h	<i>P. variotti</i> 48h	<i>P. variotti</i> 120h	<i>T. virens</i> 48h	<i>T. virens</i> 120 h	<i>S. aureus</i> (24h)	<i>E. coli</i> (24h)
EXHID-13	0,5	0,5	0,2	0,2	0,4	0,4	0,7	-

- HTC-1

Tabla 34: Resultados microbiológicos de la muestra HTC-1 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48 h	<i>A. niger</i> 120 h	<i>Rh. s.</i> 48 h	<i>Rh. s.</i> 120 h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
HTC-1	0,6	0,6	0,8	0,7	0,6	0,5
HTC-1 1/2	0,7	0,7	0,5	0,5	0,7	0,5
HTC-1 1/4	0,7	0,6	-	-	-	0,6

“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción

- HTC-2

Tabla 35: Resultados microbiológicos de la muestra HTC-2 mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	<i>A. niger</i> 48h	<i>A. niger</i> 120h	Mix 846 48 h	Mix 846 120h	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
HTC-2	-	-	0,1	-	0,4	0,1

Tras finalizar las evaluaciones y analizar todos los datos obtenidos se observaron las siguientes conclusiones:

- Los extractos que presentaron mejores resultados microbiológicos fueron en primer lugar el producto HTC-1. Dicho producto proviene de las fracciones líquidas de la carbonización hidrotermal de las cáscaras de naranjas. En este caso el producto inhibió el crecimiento de todos los hongos y bacterias estudiados, incluso 120 horas después, en el caso de los hongos. Este efecto se mantuvo al diluir el producto a la mitad. Incluso al diluirlo a la cuarta parte, todavía mantuvo la inhibición del crecimiento en el hongo *Aspergillus niger* y en la bacteria Gram negativa *E. coli*.
- También fue evidente que los extractos provenientes de nudos mostraban un mayor efecto biocida, que los extractos provenientes de madera o restos de poda. Este efecto se observó en especial, en el caso del *Pinus halepensis*. En este caso, EXHID-1, que proviene de la extracción de nudos sin purificar, presentó inhibición del crecimiento fúngico para todas las especies de hongos estudiadas, así como dicha inhibición se mantuvo a las 120 horas, para hongos. Para bacterias también mostró una fuerte inhibición del crecimiento de bacterias Gram +, como *S. aureus*, en cambio no presentó ningún efecto en las bacterias *E. coli*, la cuales son Gram -. También se observó inhibición del crecimiento microbiano, tanto para hongos como para bacterias, en las muestras EXHID-3-1 (la cual proviene de la purificación del extracto de nudos de *P. halepensis*, en las que el compuesto de interés es el limoneno) y en la muestra EXHID-3-3b diluida en acetona y analizada con la técnica de difusión en pocillos, la cual proviene de la purificación del extracto de nudos de *P. halepensis*, en las que el compuesto de interés es la pinosilvina. La muestra EXHID-3-1 dio resultados similares a la muestra EXHID-1, inhibiendo el crecimiento en todos los microorganismos excepto en la bacteria *E. coli*. En cambio, EXHID-3-3b dio todavía mejores resultados, inhibiendo incluso el crecimiento de *E. coli*, destacando la importancia biocida del compuesto pinosilvina.
- La otra especie en la que se analizó el extracto de sus nudos fue el *Pinus sylvestris*, EXHID-13. En este caso, también se observó efectividad frente a todos los hongos, en especial *A. niger*, en el que el halo de inhibición fue más grande. Esta inhibición del crecimiento se mantuvo en todos los hongos igual después de 120h. En cuanto a las bacterias se observó que inhibe el crecimiento de la bacteria *S. aureus* (Gram +), en cambio no presenta ningún efecto en las bacterias *E. coli* (Gram -).
- Cabe resaltar los resultados obtenidos con la especie *Tamarix sp.*, en la que los estudios microbiológicos muestran que el extracto EXHID-11 presenta un considerable halo de inhibición frente a las dos especies bacterianas estudiadas, *S. aureus* (Gram +) y *E. coli* (Gram -). Estos



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

resultados son muy prometedores ya que su efecto bactericida es elevado y consigue ser efectivo incluso frente a bacterias Gram -, que se consideran más resistentes por su estructura de membrana. En cuanto a los hongos, se observó inhibición del crecimiento de ambos hongos a las 48h, la cual no se mantuvo a las 120 horas.

- También se observó con el extracto EXHID-8, procedente de ramas y hojas de olivo, que presenta inhibición del crecimiento para una de las especies de bacterias estudiadas, *S. aureus* (Gram +), y una de las especies de hongo analizadas, *A. niger*, tanto a las 48 horas como a las 120 horas. Este extracto, es pues efectivo para determinadas especies de microorganismos, no presentando efecto en otros.
- Con el resto de los extractos se obtuvieron resultados mediocres, en los que no se presentaba inhibición del crecimiento microbiano, o ésta tan solo aparecía de manera ligera para determinados microorganismos.

**6.2.2 Evaluación del comportamiento hidrófobo de los bioproductos**

En el presente proyecto han sido evaluadas otras propiedades de los extractos de biomasa agroforestal estudiados en el proyecto AGROFOREF, como, por ejemplo, la capacidad hidrófoba que pueden aportar a recubrimientos. Pinturas y barnices formulados con extractos agroforestales pueden llegar a ser una alternativa más respetuosa medioambientalmente frente a aditivos sintéticos comunes y extendidos en las formulaciones de recubrimientos actuales.

Fueron evaluadas varias probetas, con una superficie de 9 cm<sup>2</sup>, impregnadas con los extractos de residuos biomásicos estudiados. Como soporte se eligió chapa de albura de haya sin tratar. Este material es clasificado como tipo 1, impregnable, según la norma UNE EN 350-2:1995, siendo, por tanto, fácil su tratamiento con los diferentes extractos.

Para una mejor manipulación y aplicación sobre el soporte de haya, los extractos se diluyeron en disolventes acetona, etanol o agua, utilizando el baño de ultrasonidos para su correcta homogeneización. Se aplicaron a brocha dos o tres capas, dejando secar mínimo 6 horas entre capa y capa, hasta aplicar aproximadamente un total 120 g/m<sup>2</sup> de extracto seco. Para comparar el comportamiento que presentan los extractos, las cantidades aplicadas en seco deben ser similares. La capacidad hidrófoba de los extractos se evaluó trascurridos 7 días de secado a temperatura ambiente. Se estudiaron todos los extractos obtenidos a excepción de EXHID-1 y EXHID-2, los cuales son equivalentes a EXHID-3, es decir, se extrajeron con acetona mediante técnica Soxhlet (ya sea en montaje tradicional o con el equipo Soxtec™ 8000).

Para evaluar la capacidad hidrófoba, se determinó la tensión superficial del sustrato, midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua desionizada sobre los distintos bio-productos aplicados, mediante un equipo con cámara estroboscópica. Para ello, se depositó una gota de agua destilada sobre la superficie aplicada y se iluminó la gota con luz difusa para producir una imagen de bordes nítidos. La imagen de la gota se proyectó sobre el objetivo de un microscopio que dispone de un goniómetro graduado. El microscopio tiene adaptada una cámara de vídeo que permitió reproducir la imagen sobre un monitor en blanco y negro.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

Los ángulos de contacto de la gota de agua sobre los bio-productos aplicados en madera de albura de haya se recogen en la Tabla 36.

**Tabla 36: Tipos de extractos, disolventes empleados para su dilución y resultados de ángulos de contacto medios.**

	Especie		Disolvente	Concentración extracto (%)	Ángulo de contacto de la gota (°)	Desviación típica
Control	-	-	-	-	41,26	8,75
EXLIP-1	<i>P.halepensis</i>	Nudos	Hexano	(*)	83,31	8,11
EXHID-3	<i>P.halepensis</i>	Nudos	Acetona	18,0	70,19	1,37
EXHID-4	<i>P.halepensis</i>	Ramas y hojas	Etanol	17,8	82,99	1,76
EXHID-5	<i>P.pinae</i>	Piñas	Etanol	18,0	75,24	7,89
EXHID-6 (A)	<i>Olea europea</i>	Madera	Agua miliQ	(*)	-	-
EXHID-6(B)	<i>Olea europea</i>	Madera	Etanol	18,0	38,32	3,10
EXHID-7	<i>Olea europea</i>	Madera	Acetona	17,8	47,21	8,17
EXHID-8	<i>Olea europea</i>	Ramas y hojas	Etanol	18,0	-	-
EXHID-9	<i>Olea europea</i>	Ramas y hojas	Acetona	18,0	-	-
EXHID-10	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Ramas y hojas	Etanol	17,8	31,40	7,09
EXHID-11	<i>Tamarix ssp</i>	Ramas y hojas	Agua miliQ	14,5	-	-
EXLIP-2	<i>Citrus sp</i>	Cáscara	Hexano	18,0	85,07	6,16
EXHID-12	<i>Citrus sp</i>	Cáscara	Acetona	18,0	-	-
EXHID-13	<i>P. sylvestris</i>	Nudos	Etanol	18,0	64,41	3,24
HTC-1	<i>Citrus sp</i>	Cáscara	-	(*)	84,13	3,35
HTC-2 (A)	<i>Olea europea</i>	Ramas y hojas	-	(*)	-	-
HTC-2 (B)	<i>Olea auropea</i>	Ramas y hojas	Agua miliQ	18,0	-	-

(\*) Extractos en estado líquido, se desconoce su concentración exacta. Han sido aplicados tal cual se han obtenido tras proceso de obtención.

Tras analizar todos los datos obtenidos en la Tabla 36 se observa lo siguiente:



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- La media del ángulo de contacto del sustrato control, sin aplicar, fue de  $41,26 \pm 8,75^\circ$ , reduciéndose con el tiempo, siendo la gota de agua absorbida por el soporte de haya. El recubrimiento EXHID-3 presentó un ángulo de contacto medio de  $70,19 \pm 1,37^\circ$  o, manteniéndose estable en el tiempo. Una mayor capacidad hidrófoba ha sido observada en el recubrimiento EXHID-4, con un ángulo de contacto medio de  $82,99 \pm 1,76^\circ$ , permaneciendo estable sobre el recubrimiento. Respecto al recubrimiento EXHID-5, se obtuvo un ángulo de contacto medio de  $75,24 \pm 7,89^\circ$ , también estable en el tiempo. El extracto EXHID-6 se aplicó diluido en agua (A) y diluido en etanol (B). El recubrimiento resultante de EXHID-6 (A), absorbió por completo la gota de agua no siendo capaz la medición del ángulo de contacto, y en la aplicación EXHID-6 (B) el ángulo medio de contacto con la gota fue de  $38,32 \pm 3,10^\circ$ , siendo también estable sobre el recubrimiento. Se observó una ligera mejora de la capacidad hidrófoba en el extracto EXHID-7, respecto de los dos recubrimientos anteriores, obteniendo un ángulo medio de  $47,21 \pm 8,17^\circ$ . Los recubrimientos EXHID-8, EXHID-9, EXHID-11 y EXHID-12 no pudieron ser evaluados, la gota de agua no quedó perlada, expandiéndose totalmente, no pudiendo determinar el ángulo de contacto. El recubrimiento EXHID-10 presentó un bajo grado de hidrofobicidad con un grado de ángulo de contacto de  $31,40 \pm 7,09^\circ$ . Buenos comportamientos han sido obtenidos en los recubrimientos de EXLIP-1, EXLIP-2 y la muestra HTC-1 obtenida por técnica de carbonización hidrotermal, mayoritariamente compuesta por limoneno, que presentaron ángulos de contacto medios de  $83,31 \pm 8,11^\circ$ ,  $85,07 \pm 6,16^\circ$  y  $84,13 \pm 3,35^\circ$  respectivamente, observando el efecto de gota perlada estable en el tiempo. El extracto EXHID-13 presentó un ángulo de contacto de  $64,41 \pm 3,24^\circ$ , permaneciendo estable en el tiempo. Este bioproducto EXHID-13 presentó una menor hidrofobicidad comparativamente con el extracto EXHID-3, también de nudos, pero de la especie *P. halepensis*. Por último, se realizaron dos aplicaciones de la muestra CH-Olivo obtenida por carbonización hidrotermal. Una de las aplicaciones, (A), se realizó con el extracto tal cual se obtiene, el cual presenta una concentración en contenido en sólidos del 3,50% y otra aplicación, (B), concentrando hasta el 18,0 % para poder comparar resultados con el resto de aplicaciones. En ambas aplicaciones no pudo determinarse el ángulo de contacto de la gota, ya que es absorbida completamente.
- Tras finalización de mediciones, en los recubrimientos EXHID-6 (B), EXHID-7, EXHID-9, EXHID-10, EXHID-11, EXLIP-2 y HTC-2 (A y B) visualmente se detectó un cambio de coloración en la parte ensayada que ha estado en contacto con la gota de agua. Ha habido una alteración del recubrimiento, posiblemente debido a una difusión de compuestos polares con elevada solubilidad en agua desde el recubrimiento hacia la gota de agua, ocasionando una pérdida de parte del recubrimiento.
- Algunos extractos obtenidos a partir de biomasa de la especie *P.halepensis* registran una buena capacidad hidrófoba. Por una parte, el extracto de sustancias lipofílicas de la parte nudosa, EXLIP-1. Esto puede ser debido, seguramente, a la presencia de sustancias de baja polaridad, extraídas con disolvente hexano. Y, por otra parte, el extracto de ramas y hojas de sustancias hidrófilas, EXHID-4.
- El extracto EXLIP-2, que presentó la mayor capacidad hidrófoba entre todos los extractos evaluados, está compuesto mayoritariamente por sustancias no polares, extraídas mediante disolvente hexano por técnica de extracción sólido-líquido Soxtec™8000. Otro extracto con mayor capacidad hidrófoba corresponde a la muestra de residuo de la carbonización



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

hidrotermal, compuesta mayoritariamente de limoneno (HTC-1), este terpeno es una sustancia no polar. Ambos extractos pertenecen a extractos de residuos de cáscara de naranja.

- Los extractos EXHID-3, EXHID-4, EXHID-5, EXLIP-1, EXLIP-2, HTC-1 y EXHID-13 aportaron a la madera una mejora del comportamiento hidrófobo, aunque no se alcanzaron ángulos mayores de 90°, no pudiendo, por tanto, clasificarlos como superficies hidrófobas.

### 6.2.3 Evaluación del comportamiento frente al fuego de los bioproductos

Con los extractos obtenidos procedentes de los diferentes residuos estudiados en el proyecto AGROFOREF, también se investigó el comportamiento frente al fuego de una determinada selección de éstos. Este estudio se realizó para comprobar, en primer lugar, que la aplicación futura de estos productos no empeorara el comportamiento frente al fuego del posible sustrato donde se aplicasen y, en segundo lugar, para investigar si alguno posee propiedades ignífugas. Estos extractos seleccionados fueron:

- EXHID-3: extracto sin purificar de nudos de *Pinus halepensis* mediante equipo Soxtec.
- EXHID-7: extracto de madera seca de *Olea europea* mediante equipo Soxtec.
- EXHID-11: extracto de restos de poda de *Tamarix sp* mediante equipo Soxtec.
- HTC-1: extracto de cáscara de naranja mediante carbonización hidrotermal (HTC).

De entre todos los bioproductos obtenidos, el extracto EXHID-11 y HTC-1 fueron elegidos por sus buenos resultados microbiológicos, así como también HTC-1 presentó buenos resultados en hidrofobicidad. Además, también se eligieron porque se encontró información en la bibliografía en la que se observó cierta resistencia frente al fuego, siendo especialmente de interés su estudio [57] [58]. Los extractos EXHID-3 y EXHID-7 se evaluaron con el fin de estudiar también el comportamiento frente al fuego de bioproductos procedentes de especies tan presentes e importantes en la Comunitat Valenciana, como son el *Pinus halepensis* y la *Olea europaea*.

El comportamiento frente al fuego de los bioproductos se evaluó mediante el ensayo de cono calorimétrico (ISO 5660-1:2015+A1:2019) teniendo en cuenta las dimensiones de las probetas. Para ello, se evaluó el comportamiento de las probetas frente a la acción de niveles controlados de irradiancia con un ignitor externo. El procedimiento se lleva a cabo mediante la norma ISO 5660-1:2015. Ensayos de reacción al fuego. Calor emitido, producción de humo y pérdida de masa. Parte 1: Tasa de emisión de calor (método del cono calorimétrico) y tasa de producción de humos (medida dinámica).

Las probetas de ensayo deben ser representativas de la muestra ensayada en su uso final. Las probetas deben ser esencialmente planas, seleccionando en este estudio dos tipos de soporte, cartulina y madera de albura de haya sin tratar, ambos con una superficie de 100 cm<sup>2</sup> (10 x 10 cm). Para una mejor manipulación y aplicación, los extractos se diluyeron empleando disolventes y el baño de ultrasonidos para su correcta homogeneización. Se aplicaron a brocha tres capas dejando secar durante 7 días a temperatura ambiente para asegurar la evaporación total del disolvente empleado en su dilución.

Normativamente, se necesitan 3 probetas de 100 cm<sup>2</sup> de lado (cuadradas), con un espesor entre 6 - 50 mm. La cantidad de bioproducto obtenido tras extracciones fue limitante a la hora de preparar las

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

probetas, no siendo posible aplicar más de dos probetas por bioproducto.

Así pues, como resultados del ensayo, se pueden calcular los siguientes parámetros, que proporcionan información útil dependiendo del objeto de la investigación del comportamiento frente al fuego de las probetas.

- **Tiempo de ignición,  $t_{ig}$  (s):** es el tiempo al que ocurre la ignición de la probeta tras 3 s de llama sostenida.
- **Duración del ensayo (s):** es el tiempo que transcurre desde el tiempo de ignición hasta el final del ensayo.
- **Heat Release Rate, HRR ( $\text{kW}/\text{m}^2$ ):** es la velocidad a la cual la probeta emite calor por unidad de área.
- **$q_{A,180\text{ s}}$  ( $\text{kW}/\text{m}^2$ ):** velocidad media de emisión de calor por unidad de área en el periodo desde el  $t_{ig}$  hasta 180 s después.
- **$q_{A,300\text{ s}}$  ( $\text{kW}/\text{m}^2$ ):** velocidad media de emisión de calor por unidad de área en el periodo desde el  $t_{ig}$  hasta 300 s después.
- **$q_{A,máx}$ , MAHRE ( $\text{kW}/\text{m}^2$ ):** es el valor máximo de emisión de calor por unidad de área.
- **Total Heat Release, THR ( $\text{MJ}/\text{m}^2$ ):** Calor emitido total de la probeta por unidad de área.
- **$m_s$  (g):** masa de la probeta en el tiempo de inflamación.
- **$m_f$  (g):** masa de la probeta al final del ensayo.
- **Pérdida de masa ( $\text{g}/\text{m}^2$ ):** pérdida de masa total de la probeta por unidad de área.
- **Tasa media de pérdida de masa ( $\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ):** velocidad media de pérdida de masa de la probeta por unidad de área.
- **MLR<sub>10-90</sub> ( $\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ):** velocidad media de pérdida de masa de la probeta por unidad de área entre el 10 % y el 90 % de pérdida de masa.
- **$S_{A,1}$  ( $\text{m}^2/\text{m}^2$ ):** emisión total de humos por unidad de área durante la fase sin llama.
- **$S_{A,2}$  ( $\text{m}^2/\text{m}^2$ ):** emisión total de humos por unidad de área durante la fase con llama.
- **$S_A$  ( $\text{m}^2/\text{m}^2$ ):** emisión total de humos por unidad de área de la muestra.

En la Tabla 37, se recogen y comparan los datos más representativos del ensayo de cono calorimétrico.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

**Tabla 37: Resultados del ensayo de reacción al fuego probetas AGROFOREF.**

Muestra	HRR (kW/m <sup>2</sup> )	THR (MJ/m <sup>2</sup> )	SA (m <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	MAHRE (kW/m <sup>2</sup> )	Pico HRR (kW/m <sup>2</sup> )	t pico (s)
Control cartulina	9,6	1,6	0	22,3	55,42	31
Control haya	49,5	16,1	32,2	58,3	179,6	160
EXHID-3 cartulina*	16,5	2,5	0	37,6	85,81	31
EXHID-3 haya	56,3	19	100,2	69	174,16	158
EXHID-7 cartulina	32,2	5	0	83,2	220,97	22
EXHID-7 haya	146,5	52,1	106,1	170,2	451,52	193
EXHID-11 cartulina*	20,43	3,6	131,4	44,4	125,00	30
EXHID-11 haya	112,3	38,0	416,5	134,8	374,97	156
HTC-1 cartulina	14,5	2,4	0	31,7	79,56	30
HTC-1 haya	72,1	23,8	90,9	82,8	209,01	173

(\*) Fueron invalidadas las probetas EXHID-3\_2 CARTULINA por defecto en la probeta y EXHID-11\_1 CARTULINA por error durante el ensayo, y por tanto no se han considerado en el cálculo de los valores medios, los resultados de las probetas.

Los soportes controles sin aplicar, cartulina y madera de albura de haya, fueron ensayados con el objetivo de cuantificar el calor que emiten, para posteriormente, evaluar en qué medida contribuyeron los extractos aplicados.

Tras finalizar los ensayos y analizar todos los datos obtenidos se observó lo siguiente:

- Reproducibilidad del comportamiento de los extractos aplicados independientemente del soporte empleado.

Se observó que todas las probetas con soporte cartulina, registraron de forma generalizada, una menor emisión de calor por unidad de área (THR). Esto es debido al tipo de soporte, ya que la cartulina control presenta menores emisiones totales de calor emitido, concretamente 1,6MJ/m<sup>2</sup>. En cambio, las probetas cuyo soporte es haya, registraron de forma generalizada mayores emisiones de calor totales, debido a que el soporte haya control presentó una emisión de calor total a lo largo del ensayo de 16,1MJ/m<sup>2</sup>. Teniendo en cuenta el calor emitido que aporta el tipo de soporte al ensayo, el % de contribución al calor emitido que aportan los extractos aplicados, en ambos soportes va en la misma línea.

- Ningún extracto aportó resistencia frente al fuego. Atendiendo a los resultados de calor emitido total de la probeta por unidad de área (THR), todas las aplicaciones aportaron en menor o mayor medida calor emitido durante la combustión de la probeta.
- Entre extractos sí se observaron diferencias de comportamiento frente al fuego.

El extracto de nudos de *P. halepensis* EXHID-3, prácticamente no contribuyó a una mayor combustión durante el ensayo, siendo este comportamiento reproducible en ambos soportes.

El bioproducto de madera de olivo EXHID-7 es el extracto que contribuyó en mayor medida a una mayor combustión, durante el ensayo se registraron mayores valores de calor emitido total, por tanto, no presenta propiedades ignífugas, sino todo lo contrario, aporta materia combustible.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

El extracto de restos de poda de taray EXHID-11, que según bibliografía consultada presenta propiedades de resistencia al fuego, contribuyó con algo de calor emitido total durante el ensayo. Se observó en ambos soportes una emisión de humos mayor que en el resto de extractos y esto es común en los materiales que resisten al fuego. Aun así, no se detectaron propiedades ignífugas, posiblemente debido a que, mediante la técnica de extracción empleada, no hayan sido extraídos los compuestos que presenten propiedades de resistencia al fuego.

El extracto obtenido por carbonización hidrotermal HTC-1, según la bibliografía encontrada, presenta propiedades ignífugas, encontrando en el mercado productos con propiedades de resistencia al fuego a partir, principalmente, de este terpeno. Se observó que prácticamente no contribuye a la combustión de las probetas. El calor emitido total que aporta durante la combustión fue muy bajo.

- Finalizados los ensayos, no se consiguió relacionar ninguno de los bioproductos agroforestales con propiedades ignífugas como tal, pero sí la observación de comportamientos interesantes. Los extractos EXHID-3 y HTC-1, ambos con importantes propiedades bactericidas e hidrófobas demostradas, aun siendo materia orgánica, no contribuyeron a una mayor combustión.

## Bibliografía

- [1] «Plan integral de fomento de la biomasa residual agrícola y forestal para uso térmico,» *Vaersa, Generalitat Valenciana*, 2006.
- [2] «[https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/servicios/banco-datos-naturaleza/informacion-disponible/tablas\\_resumen\\_IFN3.aspx](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/servicios/banco-datos-naturaleza/informacion-disponible/tablas_resumen_IFN3.aspx),» Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. IFN3 (Inventario Forestal Nacional 3), 2007. [En línea].
- [3] «Plan de acción territorial forestal de la Comunitat Valenciana – PATFOR.».
- [4] «<https://agroambient.gva.es/documents/162218839>,» EVOLUCIÓN DE LA SUPERFICIE DE TIERRAS DE CULTIVO DE LA COMUNITAT VALENCIANA 1983-2020; Generalitat Valenciana, Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica, 2020. [En línea].
- [5] W. Ji y X. Ji, «Comparative Analysis of Volatile Terpenes and Terpenoids in the leaves of Pinus Species - A Potentially Abundant Renewable Resource,» *Molecules*, vol. 5244, p. 26, 2021.
- [6] T. Ghaffari, H. Kafil, S. Asnaashari, S. Farajnia, A. Delazar, S. Baek, H. Hamishehka y K. Kim, «Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from the Aerial Parts of Pinus eldarica Grown in Northwestern Iran,» *Molecules*, vol. 24, 2019.
- [7] S. S. Dahham, Y. M. Tabana, M. A. Iqbal y M. B. Ahamed, «The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene from the essential oil of Aquilaria crassna.,» *Molecules*, vol. 20, n° 7, pp. 11808-11829, 2015.
- [8] E. Smith, E. Williamson, M. Zloh y S. Gibbons, «Isopimaric acid from Pinus nigra shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of Staphylococcus aureus,» *Phytotherapy Research*, vol. 19, n° 6, pp. 538-542, 2005.
- [9] B. J. Kopper, B. L. Illman, P. J. Kersten, K. D. Klepzig y K. F. Raffa, «Effects of diterpene acids on components of a conifer bark beetle–fungal interaction,» *Environ Entomol*, vol. 34, p. 486–493, 2005.
- [10] V. Vek, I. Poljanšek, M. Humar, S. Willför y P. Oven, «In vitro inhibition of extractives from knotwood of Scots pine (Pinus sylvestris) and black pine (Pinus nigra) on growth of Schizophyllum commune, Trametes versicolor, Gloeophyllum trabeum and Fibroporia vaillantii,» *Wood Science and Technology*, p. (54) 1645–1662, 2020.
- [11] S. Bakrim, H. Machate, T. Benali, N. Sahib, I. Jaouadi, N. El Omari, S. Aboulaghra, S. P. Bangar, J. M. Lorenzo, G. Zengin, D. Montesano, M. Gallo y A. Bouyahya, «Natural Sources and Pharmacological Properties of Pinosylvin,» *Plants*, vol. 11, n° 12, 2022.
- [12] S. Savluchinske-Feio, M. J. Marcelo Curto, B. Gigante y J. C. Roseiro, «Antimicrobial activity of resin acid derivatives,» *Applied microbiology and Biotechnology*, vol. 72, n° 3, pp. 430-436, 2006.
- [13] A. V. Nada, D. Suzana, R. S. Mihailo, P. S. Slobodan y P. D. Slobodan, «Antimicrobial activity of essential oil of Helichrysum italicum L., Asteraceae.,» *Association for Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (AMAPSEEC)*, pp. 323-329, 2006.
- [14] B. Hassan, M. E. Mankowski, G. Kirker y S. Ahmed, «Effects of heartwood extractives on symbiotic protozoan



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

communities and mortality in two termite species,» n° 123, pp. 27-36, 2017.

- [15] M. Himejima, K. R. Hobson, T. Otsuka, D. L. Wood y I. Kubo, «Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: A defense mechanism against microbial invasion,» *Journal of Chemical Ecology*, vol. 18, n° 10, pp. 1809-1818, 1992.
- [16] O. Herrera-Calderon, H. Chavez, E. C. Enciso-Roca, P. W. Común-Ve, R. D. Hañari-Quispe, L. Figueroa-Salvad, E. Loyola-Gonzales, J. B. Pari-Olarte, N. H. Aljarba y S. Alkaht, «GC-MS Profile, Antioxidant Activity, and In Silico Study of the Essential Oil from *Schinus molle* L. Leaves in the Presence of Mosquito Juvenile Hormone-Binding Protein (mJHBP) from *Aedes aegypti*,» *BioMed Research International*, vol. 2022, pp. 1-16, 2022.
- [17] L. A. Fadipe, H. Babayi y O. A. Anselm, «Isolation and in-vitro assessment of two indole alkaloids from *Pericopsis laxiflora* leaf extract for their antibacterial potentials,» *Journal of Chemical Society of Nigeria*, vol. 447, p. 1165 – 1172, 2019.
- [18] Z. S. Mitić, B. Jovanović, S. C. Jovanović, Z. Z. Stojanović-Radić, T. Mihajilov-Krst, N. M. Jovanović, B. M. Nikolić, P. D. Marin, B. K. Zlatković y G. S. Stojanovi, «Essential oils of *Pinus halepensis* and *P. heldreichii*: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity,» *Industrial Crops and Products, Volume 140, 2019, 111702, ISSN 0926-6690.*, vol. 140, 2019.
- [19] H. Albazaz, I. S. Al-jubori, . R. Eldalawy y N. Nasser, «Antimicrobial and Antioxidant Activity *Pinus halepensis* Miller. Cone Extract which grown in Iraq,» *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol. 11, p. 4977, 2018.
- [20] F. Macchioni, P. Cioni, G. Flamini, I. Morelli, S. Maccioni y M. Ansaldi, «Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy,» *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 18, pp. 139-143, 2003.
- [21] A. Gupta y E. Jeyakumar, «Journey of Limonene as an Antimicrobial Agent,» *J Pure Appl Microbiol*, vol. 15, n° 6923, pp. 1094-1110, 2021.
- [22] A. Ben Hsouna, N. Ben Halima, S. Abdelkaf y N. Hamdi, «Essential Oil from *Artemisia phaeolepis*: Chemical Composition and Antimicrobial Activities,» *Journal of Oleo Science*, vol. 62, n° 12, pp. 973-980, 2013.
- [23] K. Jassal, S. Kaushal, Rashmi y R. Ran, «Antifungal potential of guava (*Psidium guajava*) leaves essential oil, major compounds: beta-caryophyllene and caryophyllene oxide,» *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 54, pp. 2034-2050, 2021.
- [24] Z. Burčová, F. Kreps, M. Greifová, M. Jablonský, A. Ház, Š. Schmidt y I. Šurina, «Antibacterial and antifungal activity of phytosterols and methyl dehydroabietate of Norway spruce bark extracts,» *Journal of Biotechnology*, vol. 282, pp. 18-24, 218.
- [25] H. VURDU, O. E. ÖZKAN, G. ZENGİN, M. AKÇA, M. C. BALOĞLU, Ç. OLGUN, E. M. ALTUNER, S. ATEŞ y A. AKTÜMSEK, «DNA Protection, Antioxidant, Antibacterial and Enzyme Inhibition Activities of Heartwood and Sapwood Extracts from Juniper and Olive Woods,» *RSC Advances*, vol. 5, 2015.
- [26] R. Japón-Luján y M. D. Luque de Castro, «Small Branches of Olive Tree: A Source of Biophenols Complementary to Olive Leaves,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, n° 11, pp. 4584-4588, 2007.
- [27] J. A. Pereira, A. Pereira, I. Ferreira, P. Valentão, P. Andrade, R. Seabra, L. Estevinho y A. Bento, «Table Olives from Portugal: Phenolic Compounds, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n° 22, pp. 8425-8431, 2006.
- [28] Intragri, «Las fitoalexinas como mecanismo de defensa en las plantas,» *Artículos Técnicos de Intagri*, vol. 97, 2017.
- [29] K. Praveen, S. Sreedharan, A. Gothe, K. Aier y K. Shivasharanappa, «Bioactive Molecules and Antimicrobial Studies of Indian Traditional Medicinal Plant *Rhus semialata* Seeds,» *Research Journal of Medicinal Plant*, vol. 13, n° 1, pp. 10-17, 2019.
- [30] V. Vanitha, S. Vijayakumar, M. Nilavukkarasi, V. N. Punitha, E. Vidhya y P. K. Praseetha, «Heneicosane — A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago zeylanica* L.,» *Industrial Crops and Products*, vol. 154, 2020.
- [31] T. Marrufo, F. Nazzaro, E. Mancini, F. Fratianni, R. Coppola, L. De Martino, A. B. Agostinho y V. De Feo, , «Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Mozambique,» *Molecules*, vol. 18, n° 9, pp. 10989-11000, 2013.
- [32] M. Rukaiyat, S. Garba y S. Labaran, «Antimicrobial activities of hexacosane isolated from *Sanseveria liberica* (Gerome and Labroy) plant,» *Advancement in medical plants Plant Research*, vol. 3, n° 3, pp. 120-125, 2015.
- [33] S. Mazzutti, C. A. Riehl, E. Ibanez y S. Ferreira, «Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago* major and *Plantago lanceolata*,» *J. Supercrit fluids*, vol. 119, pp. 211-220, 2017.
- [34] I. H. Khan y A. Javaid , «Identification of Biologically Important Compounds Identification of Biologically Important Compounds,» *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 14, n° 3, pp. 359-365, 2021.
- [35] M. Abubakar y M. Runner, «GC-MS analysis of and preliminary antimicrobial activity of *Albizia adianthifolia* (Schumach) and *Pterocarpus angolensis* (DC),» *Medicines*, vol. 3, pp. 1-9, 2016.



**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**

- [36] M. Białoń, T. Krzyśko-Lupicka, A. Pik y P. P. Wiczorek, «Chemical Composition of Herbal Macerates and Corresponding Commercial Essential Oils and Their Effect on Bacteria Escherichia coli,» *Molecules*, vol. 22, 2017.
- [37] J. Espinoza, A. Urzúa, L. Sanhueza, M. Walter, P. Fincheira, P. Muñoz, L. Mendoza y Wilkens, «Essential Oil, Extracts, and Sesquiterpenes Obtained From the Heartwood of Pilgerodendron uviferum Act as Potential Inhibitors of the Staphylococcus aureus NorA Multidrug Efflux Pump,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 337, 2019.
- [38] J. A. Pérez-Pimienta, E. E. Rios-Del Toro, H. J. Amezcuita-García y C. Escamilla-Alvarado, «5 - Advances in biofuels and by-products from lignin,» de *Sustainable Biofuels*, Academic Press, 2021.
- [39] J. Yun, L. Wei, W. Li, D. Gong, H. Qin, X. Feng, G. LI, Z. Ling, P. Wang y B. Yin, «Isolating High Antimicrobial Ability Lignin From Bamboo Kraft Lignin by Organosolv Fractionation,» *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 26, n° 9, p. 2021.
- [40] R. Sultana, R. Nath y R. Hossain, «Isolation of Flaccidine, 3-Sitostenone and  $\beta$ -Sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from Polygonum hydropiper and Evaluation of their Antimicrobial Activities,» vol. 32, pp. 26-30, 2019.
- [41] M. d. I. A. Sáenz Esqueda, R. Álvarez Román, R. Castro Ríos, R. Gómez Flores, M. A. Nuñez Rodríguez, S. A. Galindo Rodríguez y A. Chávez Montes, «Actividad antituberculosa del extracto de Carya illinoensis,» *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, vol. 43, n° 3, pp. 36-44, 2012.
- [42] D. Castañeda-Antonio, A. Rivera-Tapia, E. Choy-Flores, R. Munguía-Pérez, R. Portillo-Reyes y J. Muñoz, «Actividad antimicrobiana del aceite de naranja residual,» *UNED*, vol. 10, n° 2, pp. 469-474, 2018.
- [43] O. O. Grace, Y. Wolde-Ab y E. O. Ogunlana, «Antibacterial constituents in the essential oil of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf.,» *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 12, n° 3, pp. 279-286, 1984.
- [44] D. Ayuni, J. N. Wahyu Karyadi, A. D. Saputro y H. Yoshii, «Effect of Antioxidant and Pro-oxidant on the Stability of Microencapsulated Squalene by Spray Drying,» 2021.
- [45] M. R. Zahi, H. Liang y Q. Yuan, «Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion,» *Food Control*, vol. 50, pp. 554-559, 2015.
- [46] A. Gupta, E. Jeyakumar y R. Lawr, «Journey of Limonene as an Antimicrobial Agent,» *J Pure Appl Microbiol*, vol. 15, n° 3, pp. 1094-1110, 2021.
- [47] J. Oliveira E Nogueira, G. Aguiar Campolina, L. R. Batista, E. Alves, A. R. Silva Caetano, R. Magalhães Brandão, D. Lee Nelson y M. d. Graças Cardoso, «Mechanism of action of various terpenes and phenylpropanoids against Escherichia coli and Staphylococcus aureus,» *FEMS Microbiol Lett*, vol. 28, n° 9, p. 368, 2021.
- [48] E. Oskoueian, N. Abdullah, S. Ahmad, W. Zuhaini Saad, A. Rahman Omar y Y. Wan Ho, «Bioactive Compounds and Biological Activities of Jatropha curcas L. Kernel Meal Extract,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, pp. 5955-5970, 2011.
- [49] N. Nićiforović y H. Abramović, «Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity,» *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 13, n° 1, pp. 34-51, 2014.
- [50] R. Haichour, M. Ramdani, T. Lograda, P. Chalard y G. Figueredo, «Chemical composition and antimicrobial activity of Pinus halepensis from Algeria,» *Biodiversitas*, vol. 21, n° 9, pp. 4345-4360, 2020.
- [51] M. Allenspach y C. Ateuer, «Alfa-pinene: A never-ending story,» *Phytochemistry*, vol. 190, p. 112857, 2021.
- [52] D. Stojković, M. Soković, J. Glamoclija, A. Dzamic, M. Ristić, A. Fahal, S. Khalid, I. Đuić y S. Petrović, «Susceptibility of three clinical isolates of Actinomodura madurae to  $\alpha$ -pinene, the bioactive agent of Pinus pinaster turpentine oil,» *Archives of Biological Sciences*, vol. 60, n° 4, pp. 697-701, 2008.
- [53] I. P. M. H. S. W. P. O. Viljem Vek, «In vitro inhibition of extractives from knotwood of Scots pine (Pinus sylvestris) and black pine (Pinus nigra) on growth of Schizophyllum commune, Trametes versicolor, Gloeophyllum trabeum and Fibroporia vaillantii,» *Wood Science and Technology*, p. (54) 1645-1662, 2020.
- [54] E. Smith, E. Williamson, M. Zloh y S. Gibbons, «Isopimaric acid from Pinus nigra shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of Staphylococcus aureus,» *Phytotherapy Research*, vol. 19, n° 6, pp. 538-542, 2005.
- [55] M. J. M. C. B. G. J. C. R. Sonia Savluchinske-Feio, «Antimicrobial activity of resin acid derivatives,» *Applied microbiology and Biotechnology*, vol. 72, n° 3, pp. 430-436, 2006.
- [56] P. Bргуete, «Fuel and chemicals from wet lignocellulosic biomass,» *Green Chemistry*, pp. 1051-1060, 2016.
- [57] H. Tributsch y S. Fiechter, «The material strategy of fire-resistant tree barks,» *High performance structures and materials IV, Boston, WIT PRESS*, p. 43, 2008.
- [58] B. M. Kobilka, J. T. Wertz y S. B. K. J. King, «Limonene-based, non-halogenated flame retardants for polymeric applications». United States of America Patente 20200140468, 05 07 2020.

**“AGROFOREF” - Obtención de compuestos químicos a partir de residuos agroforestales mediante procesos de bio-refinado para su uso en la industria de la madera, el mueble y la construcción**



**GENERALITAT  
VALENCIANA**

**IVACE**  
INSTITUTO VALENCIANO DE  
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL



**Cofinanciado por  
la Unión Europea**