



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

Instituto de Tecnología Química
(UPV/ CSIC)

**ESTUDIO DE LAS PLANTAS
LATICÍFERAS COMO POTENCIALES
CULTIVOS ENERGÉTICOS
PARA CLIMA SEMIÁRIDO**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Pablo Vicente Escrig Aparici

Dirigida por:

Dra. Nuria Cabedo Escrig

Dr. Domingo J. Iglesias Fuente

Valencia, Enero de 2014

Doña NURIA CABEDO ESCRIG, Doctora en Farmacia por la Universidad de Valencia, y

D. DOMINGO J. IGLESIAS, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de las plantas laticíferas como potenciales cultivos energéticos para clima semiárido”** realizada por Pablo Vicente Escrig para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Y para que así conste, firman este certificado en Valencia a 13 de Enero de 2014

Fdo. Dra. Nuria Cabedo

Fdo. Dr. Domingo J. Iglesias

*A mi esposa Macarena
a Vicente i Emilia, els meus pares
als meus germans David i Ana
a Trufa i a Max.*

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento mas esperado por mí desde que empecé con esta tesis allá por la primavera del año 2008. Van a ser casi seis años de momentos buenos y malos pero en los que he redescubierto, por suerte para mí, lo que es la ayuda desinteresada y el valor del compromiso con un proyecto; desearía dedicar unas líneas a expresar mi gratitud hacia todas aquellas personas que han ayudado a que esta tesis fuera posible.

Al Professor Avelino Corma, per l' extraordinària oportunitat que em va concedir a l'hora de fer esta investigació, així com els seus consells i tot el suport material donat al llarg de tot este temps. Ha sigut un verdader honor treballar a les seues ordres i espere haver estat sempre a l'alçada.

A la meua directora de tesi la Dra. Núria Cabedo sense la qual esta tesi no haguera sigut la que és. La gran dedicació a este treball, l' enorme paciència que ha tingut amb mi (només ella i jo sabem fins a quin punt) i el seu gran esforç en fer de mi un bon tècnic de laboratori, han permés en gran mesura traure avant aquest treball. Moltes gràcies Núria per tota l'ajuda i tot allò que m'has ensenyat.

Al Dr. Domingo Iglesias, el segundo de mis directores cuyo compromiso con esta investigación ha sido total desde el principio y cuyos consejos han sido imprescindibles para la realización de mi tesis. Sirvan estas líneas para transmitirle mi más sincero agradecimiento. Mi investigación no estaría completa sin el trabajo que realicé en Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, donde tuve la inmensa suerte de conocerle.

Muchas gracias al Profesor Jaime Primo por haberme acogido en su laboratorio durante más de cuatro años, por haberme tratado siempre con amabilidad y cariño, y por haber estado siempre disponible para cualquier cosa que he podido necesitar.

Al Dr. Eduardo Primo que apareció en el momento justo en el transcurso de mi investigación, me transmitió ilusión y ganas de trabajar e hizo que no me importara estar horas y horas delante del ordenador o tomando datos en el campo.

Al Profesor Herminio Boira y sus colaboradores la Dra. Mercedes Verdaguer y el Dr. Garcia Rellán que me aconsejaron en todos los temas relacionados con la selección de especies, me acompañaron y me ayudaron

sobretudo en las primeras etapas de esta investigación. Ha sido un verdadero placer trabajar con ellos y que me honren con su amistad.

Moltes gràcies a Ilde i Juan: perquè m'han ajudat quan ho he necessitat i perquè a pesar de tots els anys que porten en el CEQA i els galons que ostenten sempre m'han fet sentir com un més. A Maria per la seua constant alegria i la seua sana ironia que ha fet que tot aquest temps i les llargues hores en el laboratori estigueren envoltades d'un ambient de treball agradable.

Un recuerdo muy especial para la Dra. Sandra Vacas por toda la ayuda que me ha brindado con los equipos de cromatografía, siempre con su sempiterna sonrisa aunque le pidiera exactamente lo mismo que le había pedido las 10 veces anteriores. Ha sido una extraordinaria compañera.

No me olvido de los doctores Vicente Navarro, Cristina Alfaro, Pilar Moya, Ignacio de Alfonso e Ismael Navarro por la gran disponibilidad que han mostrado

Tampoco querría dejar pasar la oportunidad de mandar un abrazo muy fuerte a Dani y a Ceci que compartieron conmigo un laboratorio que siempre se quedaba pequeño cuando trabajábamos los tres.

Al Dr. Francisco Legaz, persona cuya laboriosidad y amor por el trabajo bien hecho es solo comparable a su bondad y gran corazón, muchísimas gracias por ayudarme a poner en marcha los experimentos en campo y por la extraordinaria meticulosidad y su desinteresada colaboración.

Moltes gràcies també a Ramon Pardo per la seua inestimable ajuda en les faenes de camp i tots els consells fruit de la seua amplíssima experiència i amor per l'agricultura. Un record especial també per a Jesus, Javi i Vicent i les magnifiques converses mantingudes en el menjador de la masia.

Las faenas delicadas nunca han sido mi punto fuerte pero he sido afortunado al contar con Ana y las dos "Isabeles" que me han enseñado (o al menos lo han intentado) la mejor forma de realizar las tareas mas tediosas haciéndome además compañía durante esas largas horas contando semillas, tamizando tierra o separando pequeñas raíces de la tierra. Muchas gracias de todo corazón chicas.

Gracias de todo corazón a las Dras. Quiñones y Martínez-Alcántara por haberme honrado con su cariño y amistad y a la Dra. Forner-Giner por haber puesto a mi disposición su laboratorio y sus equipos.

Una abraçada forta a la resta dels meus companys del IVIA, Enric, Mari Carmen, Carmen, Aurelio, Almudena, Mamen, Mari Rús, Fuen... gràcies per fer-me sentir un més.

A todos vosotros va dedicada esta tesis y mi más sincero agradecimiento.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral concedida por la Cátedra Cemex de Sostenibilidad

	Índice
	<i>página</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes generales sobre los biocombustibles	2
1.1. Clasificación de los biocombustibles	2
1.1.1. Biocombustibles primarios	2
1.1.2. Biocombustibles secundarios	3
<i>1.1.2.1. Biocombustibles de primera generación</i>	3
<i>1.1.2.2. Biocombustibles de segunda generación</i>	6
<i>1.1.2.3. Biocombustibles de tercera generación</i>	7
1.2. Procesos utilizados en la obtención de biocombustibles secundarios	8
1.2.1. Conversión termoquímica	8
1.2.2. Conversión biológica	10
1.2.3. Conversión química	12
1.2.4. Conversión de la biomasa en refinerías convencionales	14
1.3. Biocombustibles de segunda generación. Origen y fuentes de obtención	18
1.3.1. Lignocelulósicos	19
<i>1.3.1.1. Miscanthus spp. como cultivo energético</i>	19
<i>1.3.1.2. Switchgrass (Panicum virgatum L.) como cultivo energético</i>	22
<i>1.3.1.3. Silvicultura de rotación corta</i>	25
1.3.2. Oleaginosos	26
<i>Jatropha curcas L. como cultivo energético</i>	26
1.4. Microalgas	31
1.5. Plantas laticíferas	34
2. Antecedentes agronómicos	40
2.1. El estrés hídrico en plantas cultivadas	42
2.2. La salinidad como factor limitante de la producción en las plantas cultivadas	44
2.3. El suelo como potencial limitante del desarrollo de los cultivos	45

	Índice
	<i>página</i>
II. OBJETIVOS	50
III. MATERIAL Y MÉTODOS	52
1. Selección de las especies. Screening botánico	52
1.1. Descripción botánica de las especies	52
1.2. Extracción en Soxhlet de las distintas especies	57
2. Optimización del método extractivo de <i>E. characias</i>	58
3. Estudio metabolómico de ecotipos salvajes de <i>E. characias</i>	59
4. Estudio metabolómico de <i>E. characias</i> cultivada	67
5. Estudio agronómico de <i>E. characias</i> cultivada	74
5.1. Ensayo 1: Estudio de la respuesta a diferentes dosis de riego	74
5.2. Ensayo 2: Estudio de la respuesta ante diferentes estreses abióticos	81
5.2.1. Estudio de la respuesta frente al déficit hídrico	81
5.2.2. Estudio de adaptación al suelo y tolerancia a la clorosis férrica	83
5.2.3. Estudio de tolerancia a la salinidad	86
5.3. Análisis estadístico de <i>E. characias</i> cultivada	88
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
1. Selección de las especies. Screening botánico	90
2. Estudio metabolómico de ecotipos salvajes de <i>E. characias</i>	91
3. Estudio agronómico de <i>E. characias</i>. Plantas cultivadas	105
3.1. Ensayo 1: Estudio de la respuesta a diferentes dosis de riego	105
3.2. Ensayo 2: Estudio de la respuesta ante diferentes estreses abióticos	118
3.2.1. Estudio de la respuesta ante la sequía	119
3.2.2. Estudio de adaptación al suelo y tolerancia a la clorosis férrica	127
3.2.3. Estudio de tolerancia a la salinidad	132
V. CONCLUSIONES	137
VI. BIBLIOGRAFÍA	141

	<i>página</i>
VII. RESÚMENES	154
1. Resumen	154
2. Resum	155
3. Abstract	156

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción de fermentación alcohólica	4
Esquema 2. Representación simplificada del proceso de trans- esterificación	5
Esquema 3. Clasificación de biocombustibles según Nigam y Singh	7
Esquema 4. Reacciones de los procesos de conversión termoquímica	9
Esquema 5. Proceso simplificado de la utilización integral de la biomasa a partir de microalgas, adaptado de Chisti	34
Esquema 6. Diagrama de aprovechamiento integral de las plantas laticíferas	48
Esquema 7. Procedimiento de extracción y análisis de los extractos según Nemethy <i>et al.</i>	57
Esquema 8. Esquema de extracción en fresco de metabolitos en plantas laticíferas	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conversión de extractos de <i>E. lathyris</i> sobre ZSM-5 en un reactor de lecho fluido a 500°C y velocidad espacial por hora y gramo de catalizador (WHSV) de 0.4	38
Tabla 2: Selectividad a productos en el cracking del biocrudo de <i>E.</i> <i>antsyphilitica</i> a diferentes ratios catalizador/carga (C/O) a 480°C, adaptada de Padmaja et al.	39
Tabla 3: Selectividad a productos en el cracking del biocrudo de <i>E.</i> <i>antsyphilitica</i> a diferentes temperaturas con C/O=3, adaptada de Padmaja et al.	40
Tabla 4. Análisis de suelo de las tres localizaciones estudiadas	61
Tabla 5. Resultados del screening previo de distintas especies, donde $n= 5-9$ (número de plantas estudiadas de la especie en cuestión); el rendimiento hexánico medio se calculó como la media aritmética de cada una de las n medias ponderadas de hojas y tallos para cada una de las especies	91
Tabla 6. Tiempo de retención (t_R) por GC-FID relativo a tetracosano ($t_R=$ 11.8 min) y en GC-MS relación m/z de los iones generados en muestras derivatizadas (ácidos grasos y alcoholes) y no derivatizadas (alcanos, alquenos, triterpenos, esteroides y aldehídos).....	94

Tabla 7. Cuantificación de los metabolitos 1-5 en hojas y tallos de <i>E. characias</i> en las tres localizaciones estudiadas durante los meses de julio y septiembre de 2009. El rendimiento de los compuestos se ha calculado como cantidad de metabolito (mg) por g de peso seco de parte aérea de la planta	98
Tabla 8. Cuantificación de los metabolitos 6-11 en hojas y tallos de ecotipos salvajes de <i>E. characias</i> de las tres localizaciones estudiadas durante julio y septiembre de 2009. El rendimiento de los compuestos se ha calculado como cantidad de metabolito (mg) por g de peso seco de parte aérea de planta	99
Tabla 9. Cuantificación de los metabolitos 12-18 en hojas y tallos de ecotipos salvajes de <i>E. characias</i> de las tres localizaciones estudiadas durante julio y septiembre de 2009. El rendimiento de los compuestos se ha calculado como cantidad de metabolito (mg) por g de peso seco de parte aérea de la planta.....	100
Tabla 10. Rendimiento en componentes de alto valor energético según el estado fenológico (fase), siendo la fase I, la prefloración (cuando la planta todavía no ha desarrollado sus órganos florales), la fase II es la época que va desde la floración a la maduración del fruto y la expulsión de la semilla y la fase III el periodo posterior a la expulsión de la semillas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Significaciones estadísticas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$	122
Tabla 11. Evolución del porcentaje de metabolitos identificados presentes en el extracto hexánico para el riego óptimo R2. Se ha cuantificado mediante GC-FID el 85% de metabolitos presentes en el cromatograma. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas ($n=3$) independientes sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases	124
Tabla 12. Evolución del porcentaje de metabolitos identificados presentes en el extracto metanólico para el riego óptimo R2. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas ($n=3$) independientes sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Los mono- y disacáridos se cuantificaron mediante HPLC-ELS y los flavonoides heterósidos mediante UPLC-PDA	126

Tabla 13. Rendimiento en extracto hexánico y metanólico con y sin riego (R y NR respectivamente). Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001.	135
Tabla 14. Crecimiento de las plantas con riego y sin riego (R y NR, respectivamente) Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001.....	137
Tabla 15. Efecto de diferentes tipo de suelo sobre el crecimiento de las plantas. S1 (pH 8.6) y S-3 (pH 6.3) son arenosos; S-2 (pH 8.4) y S-4 (pH 6.5) son franco-arcillosos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001	138
Tabla 16. Rendimiento en extracto hexánico y metanólico de la parte aérea de plantas cultivadas en diferentes tipos de suelos. S1 y S-3 son arenosos; S-2 y S-4 son franco-arcillosos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001	139
Tabla 17. Parámetros fotosintéticos en hojas de plantas cultivadas en diferentes tipos de suelo. S1 y S-3 son arenosos; S-2 y S-4 son franco-arcillosos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001	141
Tabla 18. Efecto de la salinidad sobre la concentración de iones salinos en hojas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001	143
Tabla 19. Efecto de la salinidad sobre los parámetros fotosintéticos en hojas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001	144

Tabla 20. Efecto de la salinidad sobre las relaciones hídricas en hojas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001	145
Tabla 21. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001	145
Tabla 22. Efecto de la salinidad sobre el rendimiento en extracto Hexánico y metanólico de la parte aérea de la planta. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001	145

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. <i>E. nicaeensis</i> subsp. <i>niccaensis</i>	56
Imagen 2. <i>E. segetalis</i> subsp. <i>segetalis</i>	56
Imagen 3. <i>E. characias</i> subsp. <i>characias</i>	56
Imagen 4. <i>Lactuca serriola</i> L	56
Imagen 5. <i>Araujia sericífera</i> Brot	56
Imagen 6. Mapa de localización de las zonas de recolección de plantas salvajes con sus correspondientes coordenadas UTM (<i>Universal Transverse Mercator</i>)	60
Imagen 7. Aspecto general de las plantas de <i>E. characias</i> una vez transplantadas al lugar de ensayo. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada), abril de 2011	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos hidrocarbonados identificados en *E. characias* y agrupados en ácidos grasos (1,3,4), alcanos (7,9,11), alcoholes (6,8), triterpenos (13-18) y esteroides (12) 95

Figura 2. Sección del cromatograma GC-FID del extracto hexánico de *E. characias* recolectada en Julio de 2009: (A) hojas de la Sierra de Espadan, (B) hojas de L'Alt Maestrat, (C) hojas de Sierra de Mariola, (D) tallos de Sierra de Espadan, (E) tallos de L'Alt Maestrat, (F) tallos de Sierra de Mariola. Compuestos: 6, hexacosanol; 7, nonacosano, 8, octacosanol; 9, hentriacontano, 10, triacontano; 11, tritriacontano; 12, β -sitosterol; 13, lanosterol; 14, butyrospermol; 15, lupen-3-ona; 16, cycloartenol; 17, lupeol; 18, 24-methylenecycloartenol 97

Figura 3. Análisis de Componentes Principales (PCA) *score plots* y *loading plots* de las concentraciones de metabolitos (mg g^{-1} peso seco de parte aérea) de los extractos hexánicos de las tres zonas geográficas estudiadas: (A) y (C) *Score plot* PC2 vs PC1, (B) *Loading plot* PC1, (D) *Loading plot* PC2. 116

Figura 4. Evolución del contenido en humedad del suelo a lo largo del periodo de estudio. La figura muestra la respuesta del suelo ante cada uno de los aportes de agua recibidos ya sean por riego o por precipitación desde julio del 2011 hasta julio de 2012 118

Figura 5. Evolución del potencial hídrico en hojas durante el periodo de estudio desde julio de 2011 hasta junio de 2012, para los distintos regímenes de riego. El valor para cada uno de los puntos es la media de un mínimo de tres repeticiones 118

Figura 6. Evolución del peso seco de la planta a lo largo del experimento para los distintos regímenes de riego aplicados. Cada valor es la media aritmética de tres observaciones independientes (n=3). Significaciones estadísticas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ 120

Figura 7. Cromatogramas de *E. characias* de plantas recolectadas en fase II (Mayo 2012) con el riego R2 (15 mm): (A) GC-FID de extracto hexánico de hojas (compuestos hidrocarbonados). Compuestos: 1, ácido palmítico; 2, fitol; 3, ácido linoleico; 4, ácido linolénico; 5, pentacosano; 8, escualeno; 9, nonacosano; 10, hexacosanol; 11, triacontano; 12, octacosanol; 13, hentriacontano; 14, α -tocoferol; 15, octacosanol; 16, tritriacontano; 17, β -sitosterol; 18, lanosterol; 19, butyrospermol; 22, cycloartenol; 23, lupeol; 24, 24-methylenecycloartenol; IS, tetracosano; (B) HPLC-ELSD de extracto

metanólico SPE1 (carbohidratos). Compuestos: **25**, D-fructosa; **26**, D-glucosa; **27**, sacarosa; **IS**, trehalose; (C) UPLC-PDA de extracto metanólico SPE2 (flavonoides). Compuestos: **28**, quercetin-3- β -glucosido; **29**, quercetin-3-xylosido; **30**, quercetin-3-arabinosido; **31**, quercitrin; **32**, quercetin-3-(2''-O-acetyl)arabinofuranosido; **33**, quercetin; **IS**, flavanona .
 123

Figura 8. Extracto hexánico por planta en los diferentes estados fenológicos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Letras diferentes en cada fase indican diferencias significativas. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 127

Figura 9. Extracto metanólico por planta en los diferentes estados fenológicos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Letras diferentes en cada fase indican diferencias significativas. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 127

Figura 10. Contenido en humedad del suelo correspondiente a las plantas no regadas (NR) y a las plantas regadas (R) durante el periodo de estudio. Cada valor es la media de tres observaciones (n=3) y se presenta con sus correspondiente errores. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 131

Figura 11. Evolución del potencial hídrico de las hojas (\square_G) en plantas no regadas (NR) y plantas regadas (R) durante el periodo de estudio. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 131

Figura 12. Relación entre el contenido en humedad del suelo y la conductancia estomática (gs) con su correspondiente ecuación de la recta de regresión ($y= 7.622x- 71.483$) con un coeficiente de determinación (R²) de 0.824 para 17 grados de libertad, P<0.001 y un coeficiente de correlación de 0.907.
 132

Figura 13. Transpiración de las hojas (E) en plantas no regadas (NR) y plantas regadas (R) Una situación de estrés hídrico conlleva un descenso de la tasa de evapotranspiración. Cada valor s el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001 133

Figura 14. Asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) en plantas no regadas (NR) y plantas regadas (R) Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001 133

Figura 15. Componentes del potencial hídrico de las hojas (Ψ_s : potencial hídrico; $\Psi\pi$: potencial osmótico; Ψ_t : potencial de turgencia). Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001 134

Figura 16. Potencial osmótico de las hojas a plena hidratación ($\Psi\pi_{100}$) y reajuste osmótico (OA). Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001 134

Figura 17. Contenido relativo en agua de las hojas (RWC)..... 136

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABA:	ácido abscísico
Aco₂:	tasa neta de asimilación de CO ₂
ANOVA:	análisis de varianza
AOAC:	siglas en inglés de la organización internacional de química analítica
BSTFA:	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BTL:	siglas en inglés del proceso de conversión de la biomasa en combustible líquido (<i>Biomass to liquids</i>)
CC:	capacidad de campo
Ci:	concentración subestomática de CO ₂
C/O:	ratio catalizador/ carga
DEPT:	siglas en inglés de incremento sin distorsión por transferencia de polarización (<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DTI:	Siglas en inglés de Ministerio de Industria y comercio de Reino Unido (<i>Department of Trade and Industry</i>)
E:	transpiración
ELSD:	High pressure liquid chromatography-Evaporative light scattering detector
ETBE:	etil <i>tert</i> -butil éter
F₀:	valor de la fluorescencia basal
F_m	valor de fluorescencia máxima
FAD:	fibra ácido detergente
FCC:	siglas en inglés del proceso de craqueo catalítico fluido (<i>Fluid catalytic cracking</i>)
FDN:	fibra detergente neutra
FDR:	siglas en inglés de reflectometría de dominio de frecuencia
FFV:	siglas en inglés de vehículo de combustible flexible (<i>flexible fuel vehicle</i>)
CG:	cromatografía de gases
GC-MS:	cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas
GC-FID:	cromatografía de gases con detector de ionización de llama
GLP:	gas licuado de petróleo
gs:	conductancia estomática
HHV:	siglas en inglés de poder calorífico superior
HMF:	5-hidroximetilfurfural
IEA:	siglas en inglés de la Agencia Internacional de la Energía
IS:	siglas en inglés de patrón interno
LDA:	lignina detergente ácida

LSD:	<i>Least Significant Differences</i>
MTBE:	metil <i>tert</i> -butil éter
OA:	siglas en inglés de ajuste osmótico
PAR:	siglas en inglés de radiación fotosintéticamente activa
PCA:	siglas en inglés de análisis de componentes principales (<i>Principal Components Analysis</i>)
PDA:	<i>photodiode array detector</i>
PF:	peso fresco
PS:	peso seco
PT:	peso en turgencia
PTFE:	politetrafluoroetileno
Q-TOF:	<i>quadrupole Time of Flight</i>
RWC:	siglas en inglés del contenido relativo de agua
SE:	siglas en inglés de error estándar
Spp:	especies
SRC:	silvicultura de rotación corta
RWC:	siglas en inglés del contenido relativo en agua
Syngas:	gas de síntesis o gas productor
TAG:	triacilgliceroles
TMS:	trimetilsilano
TMCS:	clorotrimetilsilano
<i>t</i>_R:	tiempo de retención
UPLC:	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
UTM:	Siglas en inglés de sistema de coordenadas transversal de Mercator (<i>Universal Transverse Mercator</i>)
VGO:	Siglas en inglés de <i>Vacuum gas oil</i> . Fracciones pesadas de petróleo crudo
WGS:	siglas en inglés de proceso de reformado con vapor (<i>water gas shift</i>)
WHSV	siglas en inglés de velocidad espacial horaria másica
θ_v:	capacitancia del suelo
Ψ_o:	potencial osmótico
Ψ_p:	potencial de turgencia
Ψ_w:	potencial hídrico
$\psi_{\pi 100}$:	potencial osmótico a saturación

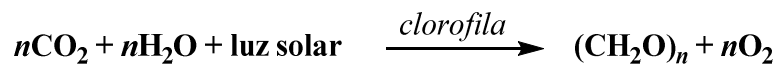
I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX se hicieron grandes esfuerzos en la investigación para el desarrollo de la tecnología de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural) debido a la relativa disponibilidad de estas fuentes y a su bajo precio. Hoy por hoy, estas materias primas se siguen utilizando en la industria para la producción de numerosos productos ampliamente demandados por la población, como por ejemplo: combustibles, polímeros, detergentes, medicamentos, productos fitosanitarios, colorantes, etc [1].

Actualmente, la utilización de los combustibles fósiles se está cuestionando desde diversos frentes, debido a su poca sostenibilidad medioambiental y económica. La quema de combustibles fósiles contribuye en gran medida al aumento del nivel de CO₂ en la atmósfera, directamente asociado con el fenómeno del calentamiento global. Paralelamente, se está produciendo un descenso en las reservas de petróleo, que unido a un aumento de la conflictividad en los países tradicionalmente productores de crudo, hacen necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de energía y de materias primas alternativas a los combustibles fósiles, y especialmente al petróleo.

Los combustibles producidos a partir de fuentes renovables, concretamente de la biomasa (biocombustibles), podrían disminuir la dependencia global de los combustibles fósiles y en particular del petróleo, además de desempeñar un papel importante en la reducción de las emisiones de CO₂ a la atmósfera. Este último aspecto es debido a que el CO₂ producido a partir de la combustión de biocombustibles equivale al CO₂ fijado por la planta en la fotosíntesis, razón por la cual no se incrementa la cantidad de CO₂ presente en la atmósfera.



Ecuación de la fotosíntesis. Conversión de CO_2 en carbohidratos

El siglo XXI puede suponer el desarrollo y perfeccionamiento de una tecnología que permita introducir en la vida cotidiana biocombustibles como otros muchos productos que hoy día proceden del petróleo, y que podrían obtenerse a partir de materias primas renovables de origen vegetal. No hay que olvidar además, que el desarrollo de los biocombustibles ofrecería una oportunidad de futuro para las comunidades rurales [2].

1. Antecedentes generales sobre los biocombustibles

1.1. Clasificación de los biocombustibles

Actualmente, podemos clasificar los tipos de biocombustibles en primarios y secundarios.

1.1.1. Biocombustibles primarios

Los biocombustibles primarios se utilizan directamente, es decir, la materia prima orgánica no necesita un proceso químico previo para su posterior utilización, tal y como ocurre con la leña, las astillas y los gránulos de madera. Estos biocombustibles se emplean en combustión directa. Los productos que se forman en la reacción química entre un combustible y el oxígeno son CO_2 y H_2O , liberando calor. Los biocombustibles primarios pueden sustituir al combustible convencional de estufas y calderas.

Presentan como ventaja importante un nivel de emisión de azufre bastante inferior al combustible convencional.

1.1.2. Biocombustibles secundarios

Los biocombustibles secundarios se obtienen mediante un procesado de la biomasa, así, pueden ser sólidos (carbón vegetal), líquidos (etanol o biodiésel) o gases (biogás, gas de síntesis e hidrógeno). A su vez, este tipo de biocombustibles se divide en biocombustibles de *primera, segunda y tercera generación*, dependiendo de la materia prima de la biomasa y la tecnología utilizada para su producción. Actualmente existen tecnologías de conversión avanzadas y eficientes para la extracción de estos biocombustibles, en forma sólida, líquida o gaseosa.

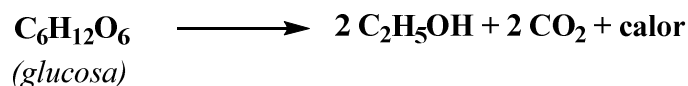
1.1.2.1. Biocombustibles de primera generación

Son aquellos obtenidos principalmente de semillas, granos [3,4] o azúcares [5,6] mediante procesos y tecnologías conocidas y comerciales. Se caracterizan por su miscibilidad con los combustibles convencionales, pueden utilizarse en motores de combustión interna mediante la tecnología del vehículo de combustible flexible (*flexible fuel vehicle*, FFV) y empleando la infraestructura actual de distribución. Dentro del grupo de los biocombustibles de primera generación se incluyen el bioetanol, biodiésel y también el biogás. La producción de biocombustibles de primera generación es una realidad, con una producción mundial anual de alrededor de 50 mil millones de litros y entre otras, presentan dos ventajas muy relevantes: su contribución a la mitigación de las emisiones de CO₂ y la reducción de la inquietud sobre la seguridad energética. Sin embargo, la comunidad científica muestra actualmente sus reservas acerca de los biocombustibles de primera generación, relacionadas con la constancia en el tiempo del suministro de materia prima, los balances de carbono y los impactos medioambientales, y sobre todo el impacto que tiene el cultivo de las

especies de interés energético en el mercado mundial de alimentos.

-Bioetanol de primera generación:

Se produce de modo natural mediante la fermentación en medio ácido (pH 4-5) de materias primas con un elevado contenido en azúcares (caña de azúcar y remolacha), o almidón (maíz, trigo y sorgo), por parte de ciertos microorganismos, generalmente levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. El proceso de obtención de bioetanol consta de una primera fase en la que se produce la hidrólisis de los azúcares complejos (sacarosa) o del almidón, según el caso, produciendo azúcares simples que mediante un proceso de fermentación, dará lugar a etanol y dióxido de carbono.



Esquema 1. Reacción de fermentación alcohólica

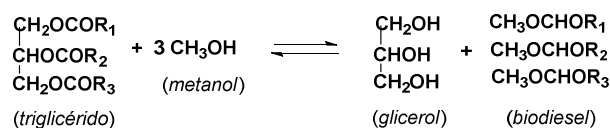
El bioetanol se puede utilizar directamente en algunos motores de combustión preparados para ello, mezclado con combustibles fósiles tipo gasolina en diferentes proporciones. Por ejemplo, mezclas con porcentaje en bioetanol de 10% y 15% (denominados respectivamente E10 y E15) pueden utilizarse en motores convencionales sin necesidad de modificaciones. También puede utilizarse en forma de ETBE (etil *tert*-butil éter) como sustituto del MTBE (metil *tert*-butil éter) para incrementar el octano de la gasolina sin plomo y disminuir la contaminación residual.

-Biodiésel de primera generación:

El biodiésel de primera generación se puede obtener a partir de una gran variedad de aceites vegetales, obtenidos a su vez de las semillas de plantas oleaginosas (soja, girasol, palma, colza, etc) mediante procesos de trans-

esterificación. Mediante la transesterificación se consigue además bajar la viscosidad y mejorar su combustión, evitando posibles daños en el motor.

El aceite (origen vegetal o grasas animales) contiene triglicéridos, es decir una serie de moléculas hidrofóbicas que constan de una unidad de glicerol unida a tres ácidos grasos. Los aceites vegetales presentan una elevada viscosidad, baja volatilidad y cierta reactividad, por lo que no es conveniente utilizarlos directamente en motores ya que podrían producir daños a medio y largo plazo. El proceso de transesterificación consiste en una serie de reacciones reversibles de un aceite o grasa (extraído por prensado o con disolventes) con un alcohol (generalmente metanol debido a su reducido precio), en presencia de un catalizador homogéneo (ácido o básico) o heterogéneo y dando como producto principal la mezcla de metil ésteres (biodiésel) y un subproducto de un alto valor añadido (glicerol) (Esquema 2) [7].



Esquema 2. Representación simplificada del proceso de transesterificación

En esta reacción de transesterificación se pueden conseguir rendimientos de hasta el 99.7% mediante un exceso de alcohol (entre el 50 y el 200%). Cabe señalar que en presencia de un catalizador sólido ácido (heterogéneo) permite eliminar los problemas ambientales derivados del uso de catalizadores homogéneos, así como las reacciones de saponificación. Los catalizadores sólidos ácidos pueden simultáneamente catalizar la transesterificación de triglicéridos y la esterificación de ácidos grasos libres a metil ésteres presentes en el aceite [8].

1.1.2.2. Biocombustibles de segunda generación

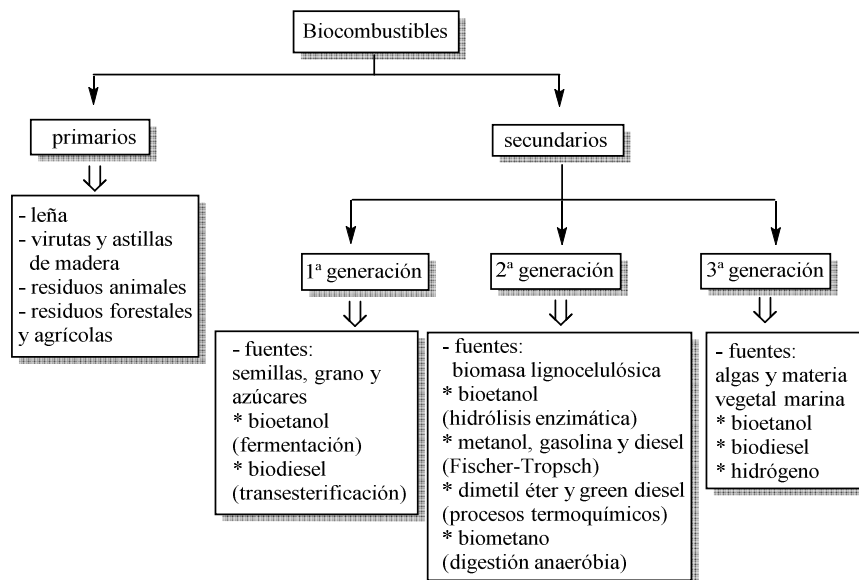
Son aquellos provenientes de la biomasa, que a diferencia de los anteriores, se obtienen a partir de cultivos no destinados a la alimentación y que pueden cultivarse en terrenos no agrícolas o tierras marginales, además de los residuos agrícolas y forestales. Se refieren fundamentalmente a materias primas de origen lignocelulósico, que constituyen la parte de biomasa más abundante y barata obtenida a partir de plantas. Su procesado implica el uso tecnologías bioquímicas y termoquímicas. Su abundancia, su bajo precio y el hecho de no competir directamente con la alimentación hacen que puedan ser interesantes. La tecnología necesaria para el procesamiento de los biocombustibles de segunda generación es más compleja que la utilizada en la primera generación, por lo que en la actualidad únicamente existen varias plantas piloto y no se lleva a cabo una producción comercial extensa [2].

Dentro de los biocombustibles de segunda generación destacan el *bioetanol lignocelulósico*, que se obtiene después de la separación y la hidrólisis de los componentes de la biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) dando lugar a azúcares que pueden fermentarse para producir etanol; *el biodiésel*, que se produce a partir de biomasa lignocelulósica mediante diferentes procesos termoquímicos englobados todos ellos bajo las siglas BTL (*Biomass to liquids*); y el *biogás* que se produce por digestión anaerobia de la materia orgánica procedente de residuos de la biomasa (estiércol de animales y otros residuos lignocelulósicos de cultivos agrícolas) mediante microorganismos, generalmente bacterias, y puede utilizarse en vehículos a gasolina con

pequeñas adaptaciones. La composición típica de este gas es una mezcla 60-70% de metano y 40-30% de CO₂ [2,9].

1.1.2.3. Biocombustibles de tercera generación

Los biocombustibles de tercera generación serían aquellos procedentes de organismos genéticamente modificados y por lo tanto, altamente especializados en la producción de energía. La Agencia Internacional de la Energía (IEA, por sus siglas en inglés) incluye en ellos a las microalgas. En este aspecto encontramos controversia en la literatura, ya que algunos autores consideran que el biodiésel procedente de microalgas forma parte de los biocombustibles de tercera generación [10,11], mientras que otros autores los clasifican dentro del grupo de biocombustibles de segunda generación [12-14]. Por último mencionaremos que dentro de los biocombustibles de tercera generación, la AIE incluye también el hidrógeno proveniente de la biomasa.



Esquema 3. Clasificación de biocombustibles según Nigam y Singh [10]

1.2. Procesos utilizados en la obtención de biocombustibles secundarios

1.2.1. Conversión termoquímica

Los procesos de conversión termoquímica implican temperaturas y presiones elevadas y dentro de ellos se incluyen los métodos de gasificación, licuefacción y pirolisis. El tiempo de residencia en el reactor, la velocidad de calentamiento y la temperatura, son los parámetros que determinan si el tratamiento termoquímico de la biomasa produce biocombustibles líquidos, gases o sólidos.

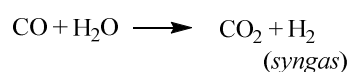
-*Gasificación*. Consiste en hacer reaccionar cualquier material carbonado (en nuestro caso, biomasa) con aire, oxígeno o una corriente de vapor, produciendo una mezcla de CO, CO₂, H₂, CH₄ y N₂ en distintas proporciones. Mediante este proceso se obtiene *syngas* (H₂), gas de síntesis o gas productor, dependiendo de la proporción relativa de cada uno de los gases y de la corriente usada para producirlo (vapor, aire u oxígeno) [15]. El gas productor se utiliza para la obtención de electricidad y/o calor, mientras que el *syngas* se usa para la obtención de combustibles de automoción ya que se obtiene H₂ mediante la reacción inversa de gas de agua o *water gas shift* (WGS) (Esquema 3).

El *biosyngas* producido a partir de la biomasa puede a su vez utilizarse para obtener biodiésel, mediante la reacción de Fischer-Tropsch. En esta reacción se obtiene una mezcla de metano, etileno, etano, gas licuado de petróleo (GLP), propano, butano, gasolina (C₅-C₁₂), diesel (C₁₃-C₂₂) y ceras (C₂₃-C₃₃) cuya distribución depende del catalizador utilizado y condiciones de reacción como temperatura, presión, etc. Las principales ventajas que presentan los procesos de Fischer-Tropsch es que pueden utilizar cualquier tipo de materia prima (carbón, biomasa o gas natural), y el combustible

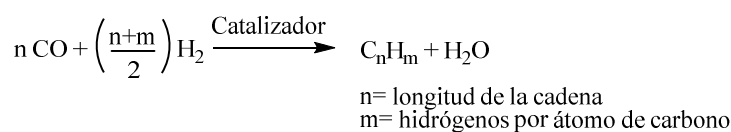
producido tiene un contenido en azufre muy bajo. Por el contrario, se obtienen compuestos de muy alto peso molecular debido a reacciones de polimerización, que posteriormente necesitan hidrocraquearse para dar lugar al biodiésel [8] (Esquema 3).

Actualmente, el syngas también se utiliza en la obtención de metanol, empleando como catalizador cobre y óxido de zinc a temperaturas de 220-300°C y presiones de 50-100 bares [16]. La síntesis de metanol es una secuencia de dos reacciones exotérmicas, la reacción de *Water Gas Shift* y la hidrogenación de CO₂ a metanol (Esquema 4).

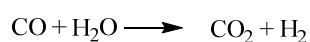
- Reacción de *water gas shift*



- Reacción de *Fischer-Tropsch*



- Síntesis de metanol



Esquema 4. Reacciones de los procesos de conversión termoquímica

-*Licuefacción.* Los procesos termoquímicos con tiempos de residencia cortos, altas velocidades de calentamiento y temperaturas moderadas favorecen, generalmente, la formación de líquidos [17]. Estos líquidos formados a partir de biomasa mediante procesos termoquímicos de licuefacción y pirolisis, reciben el nombre de bioaceite (*bio-oil*). El proceso

de licuefacción consiste en convertir directamente los materiales lignocelulósicos en un líquido similar a los *fuel-oils* pesados, cuando reaccionan con el gas de síntesis en presencia del catalizador adecuado [18]. La licuefacción en medio acuoso implica la desagregación de la ultraestructura leñosa seguida de una despolimerización parcial de sus componentes.

-*Pirólisis*. La pirólisis consiste en la degradación térmica de la biomasa por calor en ausencia de oxígeno. Se produce carbón vegetal, bioaceite (*bio-oil*) y productos combustibles gaseosos [2]. Dependiendo de las condiciones de operación, la pirólisis puede ser de tres tipos: convencional, rápida y *flash*.

1.2.2. Conversión biológica

El material lignocelulósico es abundante en plantas de cultivos no destinados a la alimentación, subproductos agrícolas, así como los provenientes de la industria alimentaria o maderera. Estructuralmente, la lignocelulosa está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa son polímeros de β -glucosa; la hemicelulosa son polímeros de xilosa y arabinosa; y la lignina son polímeros de fenilpropanoides.

Estos azúcares son liberados mediante hidrólisis química o enzimática y posteriormente, mediante un proceso de fermentación (ej. enzimática) se pueden transformar en bioalcohol (bioetanol), biocombustible u otros productos de interés. Así pues, la conversión de este tipo de biomasa en bioetanol requiere un proceso que incluye 3 etapas: pretratamiento de la biomasa, hidrólisis enzimática y finalmente un proceso de fermentación

destilación. En el pretratamiento, generalmente mediante el proceso de explosión de vapor [19], se separa la celulosa de la hemicelulosa y la lignina para facilitar la posterior ruptura de las moléculas constituyentes de la misma en azúcares simples con la hidrólisis enzimática. Estos azúcares pueden fermentarse dando alcohol; mientras que la fracción de hemicelulosa dará lugar a xilosa, cuyo proceso de transformación en etanol es bastante más complejo. La lignina tiene que procesarse aún más para producir otros biocombustibles.

El almidón es un polisacárido de glucosa con enlaces glicosídicos α -1,4 (amilosa) y α -1,6 (amilopectina), que debido a su estructura macromolecular no puede fermentarse directamente a etanol con la tecnología convencional. En primer lugar, debe romperse su estructura macromolecular dando moléculas más pequeñas (glucosa). Para ello, se utiliza una enzima α -amilasa termoestable que produce dextrinas solubles (oligómeros de glucosa), en un proceso conocido como licuefacción. Posteriormente, la hidrólisis de las dextrinas se realiza con la enzima glucoamilasa generando moléculas de glucosa, en un proceso denominado sacarificación. Finalmente, se realiza la fermentación mediante levaduras, generalmente *Saccharoyces cerevisiae* o *Zymomonas mobilis*, que metabolizan la glucosa a etanol. En teoría y según se deduce de los cálculos estequiométricos de Gay Lussac en el siglo XIX, la conversión máxima de glucosa a etanol sería del 51%, pero las levaduras utilizan una parte de la glucosa para la producción de su propia masa celular y de otros productos metabólicos distintos del etanol, así que en la práctica un 40-48% de glucosa se convierte en etanol [20].

También puede realizarse la digestión anaeróbica de la biomasa, es decir, las bacterias anaerobias en ausencia de oxígeno degradan la materia orgánica presente en la biomasa produciendo una mezcla de metano y CO₂, en proporción 70/30. La digestión anaerobia de residuos sólidos urbanos produce la misma proporción de metano y CO₂. Estos dos componentes junto con N₂, O₂ atmosférico y trazas de compuestos orgánicos, son conocidos como *Landfill Gas*. Es un gas natural de baja calidad que requiere la eliminación de diversos componentes orgánicos volátiles, así como SH₂ y CO₂ [21].

1.2.3. Conversión química

Los principales procesos de conversión química de la biomasa son: la hidrólisis química, la extracción con disolventes, la utilización de agua en condiciones supercríticas y el hidrotatamiento.

-Hidrólisis química. La conversión de biomasa a etanol requiere un proceso de pretratamiento (por métodos químicos, físicos, térmicos o una combinación de los tres) seguido de la hidrólisis enzimática de la celulosa, un proceso de fermentación y finalmente la separación de los productos por destilación. El pretratamiento pretende degradar la estructura cristalina de la celulosa, aumentar el área superficial de la biomasa, separar la hemicelulosa y romper la estructura de la lignina [22]. La cinética del proceso de degradación de azúcares catalizada por ácidos implica la hidrólisis de la celulosa a una molécula de glucosa, seguida de una degradación de la glucosa a 5-hidroximetilfurfural (HMF) y ácido levulínico. El ácido levulínico se puede transformar en ésteres levulínicos y metil-tetrahidrofurano, que se utilizan como aditivos oxigenados para diésel y gasolina [8].

-Extracción con disolventes. Consiste en extraer selectivamente los compuestos deseados, solubles en un disolvente adecuado, y posterior recuperación de los mismos. Este tipo de extracción implica: extracción del aceite a partir de las semillas con hexano, destilación de la mezcla aceite-hexano y tostado del residuo. Otros disolventes utilizados: diclorometano, acetona, etanol, isopropanol e incluso CO₂ en condiciones supercríticas [23,24].

-Agua en condiciones supercríticas. Un fluido supercrítico es una sustancia que está en unas condiciones de temperatura y presión por encima de su punto crítico que en el caso del agua es de 371°C y 22 MPa, y para el CO₂ 31°C y 7.4 MPa [25]. Los compuestos en condiciones supercríticas se encuentran en la interfase entre un líquido y un gas. El procesado de biomasa con agua en condiciones supercríticas es una alternativa a la hidrólisis ácida y enzimática de la celulosa, puesto que se trata de procesos costosos, contaminantes o necesitan de pretratamiento. El agua en condiciones supercríticas puede convertir la celulosa en azúcares y la biomasa en una mezcla de aceites, ácidos orgánicos, alcoholes e hidrocarburos. El agua en condiciones supercríticas es muy reactiva. A medida que la temperatura se va acercando a 600°C el agua supercrítica se va convirtiendo en un oxidante fuerte y se produce una desintegración de la estructura del substrato lignocelulósico, por transferencia de oxígeno desde el agua a los átomos de carbono del sustrato. Los átomos de hidrógeno del agua se liberan formando H₂ [26].

-Hidrotratamiento de aceites vegetales. Los aceites de colza, soja, canola y palma, están ampliamente orientados a la producción de biodiésel. Su uso generalizado en el futuro depende del desarrollo de nuevas tecnologías de

procesado en la producción de combustibles para la automoción de alta calidad. Estos nuevos biocombustibles deben ser compatibles con los combustibles convencionales para ser económicamente viables.

El diésel verde, presenta un elevado contenido en isoparafinas, y se obtiene mediante procesos de saturación catalítica, hidrodeshidrogenación, descarboxilación e hidro-isomerización, de los ácidos grasos y triglicéridos presentes en los aceites vegetales. No contiene compuestos aromáticos ni azufre, y posee un alto número de cetano. Sus propiedades en frío se pueden ajustar durante el proceso de fabricación para cumplir las especificaciones ambientales [26]. Este tipo de diésel es completamente compatible con el diésel convencional.

1.2.4. Conversión de biomasa en refinerías convencionales

Aunque en rigor esta tecnología debería ser mencionada dentro de los procesos químicos, la resaltaremos aparte, ya que esta tecnología sería la más conveniente para convertir los extractos de las plantas laticíferas en combustibles. Estos procesos implican una co-alimentación de la refinería de petróleo convencional con materias primas procedentes de la biomasa. Generalmente, se utilizan los siguientes tres métodos para la conversión de biomasa en combustibles y otros productos químicos: craqueo catalítico en lecho fluidizado (FCC, por sus siglas en inglés), hidrocraqueo-hidrotratamiento y uso del *syngas* o del hidrógeno derivado de la biomasa. Aquí, sólo comentaremos los dos primeros métodos ya que el tercero ha sido descrito en apartados anteriores.

-*Craqueo catalítico*. El craqueo catalítico fluido (*fluid catalytic cracking*, FCC) es un proceso ampliamente utilizado en las refinerías para la conversión de fracciones pesadas de petróleo crudo (*vacuum gas oil*, VGO)

en gasolina y otros hidrocarburos [27]. En este proceso distinguimos principalmente dos zonas de reacción. En la primera zona, se pone en contacto el catalizador caliente con el VGO, obteniendo los productos resultantes del craqueo y el catalizador contaminado de coque. Tras esta reacción, el catalizador se separa de los productos, se desprende el crudo residual por vapor y posteriormente el catalizador se regenera quemando el coque a 650- 760°C y 2 bares. El catalizador caliente está listo para reutilizarse en reacciones posteriores.

Las reacciones que ocurren en el proceso FCC incluyen reacciones de craqueo, es decir, craqueo de alcanos, alquenos, naftenos y compuestos aromáticos a productos más ligeros; pero también, reacciones de transferencia de hidrógeno, isomerización y reacciones de formación de coque [28]. Suelen usarse catalizadores ácidos sólidos tipo zeolitas, que son materiales microporosos cristalinos con tamaño de poro definido.

Los materiales lignocelulósicos, así como los bioaceites, pueden ser transformados mediante craqueo catalítico. El craqueo catalítico presenta una serie de ventajas con respecto a los tratamientos convencionales de los materiales lignocelulósicos, ya que no se requiere hidrógeno, el procesado en condiciones atmosféricas reduce el coste de operación y las temperaturas empleadas son similares a aquellas que se utilizan en la producción de bioaceite. Por el contrario, pueden darse bajos rendimientos en hidrocarburos así como un alto grado de producción de coque. Los productos del craqueo catalítico de la biomasa incluyen hidrocarburos aromáticos y alifáticos, productos orgánicos solubles en agua, productos orgánicos liposolubles, gases (CO₂, CO y alcanos ligeros) y coque. Los hidrocarburos procedentes de la biomasa son deficientes en hidrógeno si los

comparamos con aquellos procedentes del petróleo. Según Chen *et al.* [29] el mayor desafío de la conversión de biomasa sería la retirada del oxígeno y el enriquecimiento en hidrógeno del producto hidrocarbonado.

La conversión de los compuestos oxigenados procedentes de la biomasa mediante FCC implica cinco clases diferentes de reacciones: (1) reacciones de deshidratación; (2) craqueo de grandes moléculas oxigenadas a moléculas más pequeñas; (3) reacciones de producción de hidrógeno; (4) reacciones de consumo de hidrógeno; y (5) producción de moléculas más largas por reacciones de formación de enlace C-C (condensación aldólica o reacciones Diels-Alder). Durante el proceso puede producirse hidrógeno a través de reacciones de reformado con vapor, deshidrogenación de los compuestos tipo carbohidratos o hidrocarbonados, reacciones de WGS y reacciones de descarbonilación de moléculas parcialmente deshidratadas [30].

El craqueo catalítico de aceites vegetales con elevado contenido en triglicéridos, implica la pirolisis de los mismos en presencia de catalizadores sólidos, generalmente zeolitas. Este proceso se ha estado estudiando desde 1921 [31] y los productos de pirolisis de los aceites vegetales se usaron como combustibles en ambas guerras mundiales. Leng *et al.* [32] propuso una ruta de reacción para el craqueo catalítico de aceites vegetales, en la que el aceite vegetal es transformado primeramente en derivados hidrocarbonados pesados y oxigenados, que posteriormente darán lugar a olefinas y parafinas ligeras (gasolina), CO, CO₂, H₂O y alcoholes. Mediante reacciones de oligomerización, las olefinas ligeras pueden dar olefinas y parafinas más pesadas que pueden usarse como gasolina, diésel o keroseno.

Estas olefinas ligeras también pueden sufrir procesos de isomerización, aromatización y alquilación para dar hidrocarburos aromáticos [30].

-Hidrotratamiento. El hidrotratamiento puede usarse para convertir los aceites procedentes de fuentes biológicas (bioaceites) en un combustible más estable con una mayor densidad energética y con la característica de poder mezclarse con materiales procedentes del petróleo. En una refinería convencional, este proceso se lleva a cabo a temperaturas de 300-600°C y presiones de H₂ entre 35-170 bares con catalizadores de cobalto-molibdeno (Co-Mo) y níquel-molibdeno (Ni-Mo). También se utilizan otros catalizadores como platino en soporte de sílice-alúmina o rutenio. Durante este proceso, el oxígeno contenido en el bioaceite reacciona con el H₂ para formar agua y enlaces saturados C-C. Es importante evitar la hidrogenación de compuestos aromáticos presentes en los aceites ya que disminuiría el número de octanos de la gasolina producida y aumentaría el consumo de hidrógeno [30].

La lignina puede convertirse en combustible mediante esta técnica de hidrotratamiento, con catalizadores estándar y a temperaturas de 250-450°C. Se producen fenoles, ciclohexano, benceno, naftaleno y fenantreno, con rendimientos en aceite del 61% basándonos en la lignina inicial [33-36].

Los aceites vegetales con un elevado contenido en triglicéridos, pueden hidrotratarse para producir alcanos líquidos con alto número de cetano y con propiedades combustibles mejores que las del biodiésel. Este proceso implica temperaturas de 350-450°C, presiones parciales de H₂ de 48-152 bares y catalizadores comerciales de hidrotratamiento de Co-Mo y Ni-Mo. El diésel proveniente de hidrotratamiento de aceites vegetales tiene la ventaja de ser compatible con la infraestructura existente, así como con los

motores diésel actuales. Así, se puede concluir que la gasolina y el diésel pueden obtenerse a partir de triglicéridos por craqueo catalítico o hidrotratamiento, respectivamente.

La biomasa de origen celulósico, abundante y barata, es también la más difícil de convertir en biocombustibles. En una refinería convencional, se requiere previamente convertir la biomasa lignocelulósica en producto líquido mediante pirolisis o licuefacción para producir bioaceites o bien mediante rutas hidrolíticas para producir azúcares solubles y lignina. El craqueo de estos productos produce olefinas y aromáticos pero también grandes cantidades de coque, bajo las condiciones estándar de FCC. Este coque puede usarse para proveer de calor al proceso o bien para producir *syngas*. El hidrotratamiento de la lignina y el bioaceite puede dar lugar a gasolina y diésel, aunque para ello se requieren altas presiones de hidrógeno [30].

1.3. Biocombustibles de segunda generación. Origen y fuentes de obtención

En la actualidad los biocombustibles denominados de “segunda generación”, están desplazando a aquellos basados en productos obtenidos a partir de cultivos alimentarios. En general, se pretende que estos cultivos no compitan directamente con la alimentación y que además puedan adaptarse a tierras marginales, con bajos requerimientos de fertilizantes y riego. Los cultivos más utilizados para la obtención de biocombustibles de segunda generación serían del tipo lignocelulósico, se pretendería obtener bioetanol (a partir de celulosa y hemicelulosa) o biodiésel. También podemos encontrar entre este tipo de cultivos, las plantas oleaginosas, como por ejemplo *Jatropha curcas*. Así atendiendo a la materia prima a partir de la

cual se pretende obtener el combustible, estos cultivos los podemos clasificar en lignocelulósicos y oleaginosos.

1.3.1. Lignocelulósicos

1.3.1.1. Miscanthus spp. como cultivo energético

Miscanthus spp. es una planta rizomatosa de metabolismo C4 para la fijación de carbono. Desde extremo oriente, se introdujo en Europa como planta ornamental en los años 30 (siglo XX). Se puede encontrar en climas tropicales y subtropicales y las zonas templadas del sudeste asiático así como en las islas del Pacífico. Como miembro de la familia Poaceae, el género está estrechamente relacionado con el género *Saccharum* (que incluye la caña de azúcar) y algunas especies de ambos géneros pueden ser fácilmente hibridadas. Existen aproximadamente 17 especies de plantas pertenecientes al género *Miscanthus*, de las cuales podemos destacar tres: *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* y el híbrido *M. giganteus*. En general podemos decir que *M. sacchariflorus* se encuentra mejor adaptado a climas cálidos mientras que *M. sinensis* puede proveer de recursos genéticos para las regiones más frías. A pesar de ser una planta de metabolismo C4 está adaptada para funcionar eficientemente a temperaturas más bajas que el resto de las plantas de este grupo [37,38].

En la década de 1950 se empezó a cultivar como cultivo energético, estableciéndose programas de selección en un amplio rango de zonas climáticas incluidas las más templadas del sur de Europa. De este programa se destacó como potencial productor de biomasa *M. giganteus*, el híbrido triploide estéril de *M. sacchariflorus* y *M. sinensis*. Una vez establecidos, los rizomas producen un crecimiento anual de los tallos de más de 3 m de altura. El ciclo de esta planta es anual y en el hemisferio norte los rizomas se

siembran en primavera y pueden recolectarse en febrero/marzo una vez hayan alcanzado la senescencia y su porcentaje de humedad haya disminuido. Cada año produce nuevos brotes que emergen desde el suelo durante el mes de abril. Estos brotes se transforman en tallos robustos que pueden alcanzar los 2 m de altura y los 10 mm de diámetro a finales de agosto del primer año. A finales de julio comienzan a secarse las hojas inferiores y durante el otoño el secado del cultivo se acelera. Durante este proceso, se comienza a producir la acumulación de nutrientes a nivel de rizomas [39], fenómeno que va acompañado de la pérdida de hojas. En invierno, desaparece totalmente el follaje y paralelamente se produce el secado de los tallos, que al final del invierno alcanzan humedades de entorno a un 40% [40]. En la siguiente primavera, coincidiendo con un aumento de las temperaturas, se inicia de nuevo el ciclo.

Las especies del género *Miscanthus*, en general, pueden crecer y desarrollarse en una amplia gama de suelos desde arenosos a arcillosos e incluso en tierras marginales, ya que poseen la capacidad de almacenamiento de agua. En cuanto a la temperatura, se acepta que con temperaturas inferiores a 6°C su sistema fotosintético se ve afectado, así como su crecimiento. Sus rizomas salen de la latencia invernal cuando las temperaturas del suelo alcanzan los 10-12°C [39].

Uno de las principales dificultades que presenta la explotación de este cultivo es su forma de propagación. Como se ha dicho anteriormente, la mayor parte de los cultivos de *Miscanthus* provienen del híbrido triploide estéril *M. giganteus* que por lo tanto debe propagarse de forma vegetativa, mediante rizomas o por micropropagación de secciones de tallos. Las variedades fértiles (*M. sinensis* y *M. sacchiflorus* e híbridos fértiles) pueden

sembrarse a partir de semillas, aunque su tamaño pequeño y su bajo contenido en nutrientes hacen que el éxito del establecimiento de la plantación sea escaso, por lo que se consiguen mejores resultados si se realiza vegetativamente, sobre todo si se utiliza la técnica conocida como macropropagación del rizoma que permite la mecanización del proceso [38].

En un exhaustivo estudio llevado a cabo por encargo del Ministerio de Industria británico (*Department of Trade and Industry, DTI*) [41] se concluyó que los rizomas deben almacenarse a una temperatura de entre 3-5°C en las 4 h siguientes a su recogida, evitándose así una exposición de los rizomas a las condiciones ambientales que reduciría drásticamente la viabilidad y el vigor de los mismos. A la hora de la plantación, los rizomas no deben permanecer fuera de la cámara más de 4 h y han de plantarse en suelos cuya humedad sea superior al 40%.

La densidad óptima de plantación es de 20000 rizomas por hectárea [42] y una mayor densidad de siembra puede dar mayores rendimientos en los primeros años del cultivo pero a medida que el cultivo madura, estos rendimientos van decreciendo. La siembra en primavera aprovecha la ventaja que ofrece la humedad del suelo y extiende la primera fase de crecimiento, favoreciendo un mayor desarrollo de los rizomas y permitiendo al cultivo tolerar mejor las posibles deficiencias hídricas.

Las plantas de *Miscanthus spp.* son perennes, y esto conlleva a bajos rendimientos en los primeros años, entre 1-2 t ha⁻¹ de materia seca, aunque Mantineo *et al.* consiguieron obtener rendimientos de 3.6 t ha⁻¹ en parcelas regadas [43], y en el tercer y cuarto año alcanzaron rendimientos de 27 t ha⁻¹ [40]. El valor calorífico medio es de 16.4 MJ kg⁻¹, obteniendo su máximo de

energía neta en el 4º año con 447.2 GJ ha⁻¹, debido al alto rendimiento en biomasa seca y una baja demanda energética de los insumos (*inputs*) [43].

Principales inconvenientes de su cultivo:

Si lo comparamos con el resto de cultivos tradicionales, el cultivo de *Miscanthus spp.* representa una opción de elevado riesgo, desde el punto de vista económico. Los altos costes de plantación del cultivo, unidos a la baja producción de los primeros meses implican un largo periodo de recuperación de la inversión inicial. En el caso de zonas de climatología semiárida como la nuestra, el requerimiento de agua necesario para el establecimiento de la plantación sería otro coste adicional. Además, aunque poco frecuente, pueden producirse heladas en los inviernos mediterráneos sobre todo en las zonas prelitorales, afectando el crecimiento (temperaturas inferiores a 6°C).

1.3.1.2. Switchgrass (Panicum virgatum L.) como cultivo energético

El switchgrass (*Panicum virgatum L.*) es una hierba perenne, erecta y de metabolismo C4, nativa de Norteamérica donde es muy común en las zonas de pradera del medio oeste de los Estados Unidos. Es una planta versátil y adaptable que puede crecer sin problemas en multitud de tipos de suelo y condiciones climáticas. La mayor parte de su periodo de crecimiento está comprendido entre el final de la primavera y las primeras semanas de otoño. Ha sido cultivada en el pasado como hierba forrajera para la temporada estival, con la finalidad de paliar el descenso de producción que presentan las demás forrajeras cuando las temperaturas ascienden. Puede crecer sin problemas en suelos considerados no aptos para los cultivos tradicionales, como por ejemplo suelos arenosos siempre y cuando estén en una región húmeda. Dentro de la especie podemos distinguir dos ecotipos basados en

sus características morfológicas y su hábitat, los ecotipos llamados “de tierras bajas” (*lowlands*) que generalmente crecen en las llanuras aluviales (por lo tanto más adaptados a zonas húmedas) son más altos, más gruesos y tienen mayor rapidez de crecimiento que los ecotipos “de montaña” (*uplands*), los cuales son de tallo más fino y bajo y están mejor adaptados a hábitats más secos [44].

Desde los años 80 se ha investigado su potencial como planta productora de biomasa para la producción de biocombustibles, debido principalmente a: su alta producción de energía neta por hectárea, sus bajos costes de producción, bajo contenido en cenizas, alta eficiencia en el uso del agua, su rusticidad y por su potencial de almacenamiento de carbono en el suelo. En los Estados Unidos se han realizado diversos ensayos de campo en diversas localizaciones, llegando a obtener rendimientos de hasta 26 t ha⁻¹ en Alabama [44]; en Europa se llegaron a obtener rendimientos medios para el tercer año de 18 y 25 t ha⁻¹ en el noroeste y el sur de Europa respectivamente, por lo que se puede concluir que los mayores rendimientos se obtienen en las zonas húmedas y cálidas debido a la mayor duración de sus periodos cálidos, factor que prolonga la época de crecimiento del cultivo.

En 1998 se iniciaron los primeros experimentos en Europa en el marco de una red europea con la finalidad de evaluar el switchgrass como cultivo energético y generar suficientes datos para poder iniciar la producción de dicho cultivo a gran escala [45]. Como resultado de este trabajo se establecieron parcelas experimentales en cinco países europeos, dos de ellos en la zona mediterránea (Italia y Grecia) y tres en el noroeste de Europa (Alemania, los Países Bajos y el Reino Unido). El objetivo de esos primeros

experimentos fue el estudio de la adaptación y de la productividad del switchgrass a las condiciones pedoclimáticas europeas. En las dos zonas mediterráneas los experimentos fueron realizados en condiciones de regadío, en suelos limoarenosos con bajos contenidos en materia orgánica. Su adaptabilidad y productividad en biomasa de todas las variedades dio resultados satisfactorios, siendo exitosa la fase de establecimiento, un factor clave a la hora de afrontar el cultivo de switchgrass. Sin embargo, en las zonas del noroeste de Europa, se encontraron con un problema importante en el segundo y tercer año, el encamado al inicio de la temporada. En ocasiones este problema se corregía hacia el final de la campaña, pero si no existía una recuperación se encontraban con un descenso considerable en el rendimiento de biomasa.

Los requerimientos de energía necesarios para el cultivo del switchgrass son favorables si los comparamos con el maíz o la soja, ya que la captura de la luz solar es mucho más eficiente debido a su metabolismo C4. El coste energético para producir biomasa a partir de switchgrass estaría entre 0.97-1.34 GJ t⁻¹, mientras que en caso del maíz sería de 1.99-2.66 GJ t⁻¹ [46]. En cuanto al rendimiento potencial en etanol por tonelada de biomasa seca con la tecnología actual sería de 380 L t⁻¹ de biomasa seca recolectada, mientras que en el caso del maíz este rendimiento alcanzaría los 400 L t⁻¹ [47]. A pesar de que el rendimiento es ligeramente menor, la ventaja de usar switchgrass en lugar de maíz deriva de sus bajos costes de producción y de su mayor contenido energético por hectárea [48]. Además, puede aprovecharse el contenido en lignina de este cultivo para quemar y obtener la energía necesaria en el proceso industrial de bioconversión en etanol. Considerando el global del proceso, la energía contenida en el etanol resulta

ser 5.4 veces mayor de la necesaria para mantener todo el proceso productivo [47].

Principales inconvenientes de su cultivo:

Una de las principales desventajas que presenta el switchgrass son los problemas asociados al inicio del establecimiento de la plantación, principalmente la latencia de las semillas y a la competencia de las malas hierbas de invierno, ya que éstas pueden incluso ahogar la plantación inicial. Esto puede ser una desventaja en latitudes más septentrionales debido al corto periodo vegetativo que tienen las plantas, mientras que en las zonas más cálidas este problema se atenúa. Una solución podría ser plantar las semillas cuando aumenten las temperaturas, siempre y cuando se haya roto convenientemente la latencia para que la plántula pueda competir con las malas hierbas, aunque esto implicaría un periodo de crecimiento vegetativo del primer año más reducido. De todas formas, incluso con una buena gestión del cultivo, no se puede esperar que el cultivo alcance su máximo rendimiento productivo antes del tercer año [44,45].

1.3.1.3. Silvicultura de rotación corta (SRC)

La silvicultura de rotación corta (*Short Rotation Coppice, SRC*) es una práctica que consiste en el cultivo de alta densidad de especies arbóreas para la producción de biomasa. Es una práctica introducida con éxito en los países escandinavos debido a la existencia de una red de sistemas de calefacción bien desarrollados. Las principales especies utilizadas para este fin son el sauce, el chopo o el álamo. Esta última especie se ha revelado como una gran productora de biomasa [49]. En lo que a las plantaciones de sauce se refiere, para este tipo de silvicultura se utilizan variedades de mimbrera (*Salix purpurea*) debido a su carácter arbustivo. En este tipo de

sistema de producción se plantan dobles filas de estaquillas de alrededor de 18-20 cm extrayéndose la madera en ciclos de 2 a 5 años, aunque es común que sea cada 3 años. El sauce de rotación corta se planta en primavera y crecerá hasta 4 m de altura en el primer año. Generalmente, durante el invierno siguiente a su plantación los tallos se recortan hasta casi el nivel del suelo con la finalidad de estimular el crecimiento de múltiples tallos. Tres años después del recorte y también durante el invierno se recolecta la madera. Una plantación puede ser viable durante 30 años, antes de que sea necesario replantar, dando rendimientos anuales en biomasa seca de alrededor de 13 t ha⁻¹ en ensayos realizados en el Reino Unido, aunque en algunos ensayos realizados con álamos en los Estados Unidos se llegaron a obtener hasta 35 t ha⁻¹ de materia seca anuales [50].

Estudios realizados en el Reino Unido afirman que las especies que se utilizan en los sistemas de silvicultura de rotación corta se adaptan a un amplio rango de tipos de suelo. Esto podría ser debido a la tolerancia *Populus* y *Salix* a las altas concentraciones de residuos tóxicos y a la asfixia radicular [50,51].

1.3.2. Oleaginosos

Jatropha curcas L. como cultivo energético

El género *Jatropha* es un género de aproximadamente 175 plantas suculentas, arbustos y árboles de la familia Euphorbiaceae. Cuando hablamos de jatrofa en el contexto de los biocombustibles de segunda generación, nos referimos a la especie llamada *Jatropha curcas*, planta que a día de hoy es uno de los principales candidatas para producir el biodiésel del futuro, ya que además de no ser comestible, es resistente a la sequía, a las plagas y produce semillas que contienen entre 27-40% de aceite [52].

J. curcas L. es un arbusto de unos 6 m de altura con una madera blanda y una esperanza de vida de más de 50 años. La planta desarrolla una raíz principal profunda de la que parten las raíces laterales superficiales, dando a la planta estabilidad y protección frente a la erosión del suelo. Las plantas maduras producen por separado flores masculinas y femeninas. Al igual que muchos miembros de la familia Euphorbiaceae, las plantas del género *Jatropha* contienen compuestos altamente tóxicos por ingestión o por contacto con la piel.

En las zonas de origen de *J. curcas* las temperaturas medias suelen estar entre 20-28°C [53] y las precipitaciones entre 250-3000 mm [54]; por lo que se puede afirmar que esta planta está bien adaptada a condiciones semiáridas. En general prefieren suelos ligeros, profundos y bien drenados puesto que debe evitarse el riesgo de encharcamiento [52]. Sin embargo a pesar de que la jatrofa ha sido extensamente cultivada, existe cierta variabilidad en los datos publicados relativos a su productividad, desconociéndose el impacto a largo plazo de su uso a gran escala sobre la calidad del suelo y el medio ambiente.

Aunque *J. curcas* se propaga fácilmente tanto vegetativamente como mediante semillas en las plantaciones destinadas a la producción de biocombustibles, se recomienda la siembra a partir de semillas [53,55]. Ello es debido a que las plantas propagadas a partir de semillas desarrollan una raíz principal profunda que tendrá más acceso al agua y a los nutrientes de las capas más profundas del suelo, por el contrario las plantas propagadas vegetativamente tienen un sistema radicular mucho más superficial, esto implica que en las zonas con menor disponibilidad de agua y nutrientes exista una mayor competencia por estos recursos [56]. Las semillas pueden

sembrarse directamente en el campo, siempre y cuando la tierra esté lo suficientemente húmeda, pero a pesar de ello Muys *et al.* [56] recomiendan la plantación previa en semillero en condiciones de invernadero y transcurridos tres meses trasplantarlas al campo. Así, se protege a la planta durante su etapa inicial de crecimiento de las condiciones adversas. El mejor momento para comenzar la plantación es durante la época de lluvias o durante la estación cálida si se dispone de agua de regadío, ya que las plántulas requieren riego durante los 2-3 primeros meses posteriores a la plantación. Debido a la competencia que se establece entre las raíces, los marcos de plantación dependen de la cantidad de agua disponible, por lo tanto las regiones subhúmedas pueden permitirse unos marcos de plantación más estrechos, mientras que en zonas semiáridas el marco de plantación debe ser más ancho. Se ha de tener en cuenta que, generalmente, el aumento de la biomasa suele hacerse a costa de perder rendimiento en fruto, y una menor distancia entre plantas implicará una mayor competencia para la captación de luz y agua, dando una menor relación fruto/biomasa. Sin embargo, algunos autores afirman que marcos de plantación más anchos aumentarían la productividad por planta [57] pero implicaría una disminución del rendimiento por hectárea del total de la explotación [58].

En lo que al riego se refiere, cabe decir que aunque no existen demasiados estudios en este aspecto, la mínima cantidad de agua necesaria para obtener una cosecha aceptable de semillas sería alrededor de 600 mm anuales [56]. En base a datos de estudios, llevados a cabo en Nicaragua y Paraguay sobre la relación entre rendimiento en peso seco de la semilla y precipitación anual por un lado y la edad de la plantación por otro, compilados por Foidl *et al.* [59], se puede decir que hay una influencia

positiva tanto del agua como de la edad de la plantación en el rendimiento en peso seco de semillas, obteniéndose rendimientos anuales de semillas secas en torno a 5000 kg ha^{-1} , con precipitaciones anuales medias de 1200 mm y árboles de 4 años [56]. De cualquier modo, como ya se ha dicho, los datos publicados hasta la fecha muestran un amplio rango de rendimiento en peso seco de semillas ya que éste depende además de factores como tipo de suelo, lluvia, métodos culturales y factores genéticos.

El fruto madura generalmente 90 días después de la floración aunque este proceso no es uniforme, esto implica que el periodo de recolección se alargue desde los 2 meses (recolecciones diarias o semanales) en regiones semiáridas, hasta un año (recolecciones semanales). Además, el proceso de recolección es manual, siendo caro y laborioso. Otro dato a considerar cuando hablamos de rendimiento en semillas, es el porcentaje que representan la cáscara y el grano sobre el total del peso seco de la semilla, este último tiene un poder calorífico de 30.4 MJ kg^{-1} y está compuesto principalmente de grasas y proteínas, mientras que la cáscara está compuesta casi exclusivamente por fibras y su poder calorífico es de 19.4 MJ kg^{-1} , por lo que si se quiere usar la semilla como fuente de biodiésel el ratio grano/cáscara de la semilla debe tenerse en cuenta. En base a observaciones publicadas en diversos estudios [56] el porcentaje de grano respecto al peso seco total de la semilla estaría en torno al 37% siendo el resto cáscara.

La obtención del aceite puede realizarse mediante procedimientos mecánicos o químicos con disolventes. Los procedimientos de extracción realizados por prensado en presa mecánica, tienen un rendimiento de entre 70-80%. Algunos pretratamientos de la semilla pueden aumentar el

rendimiento en aceite y llevarlo hasta el 90%. Los métodos químicos de extracción que utilizan n-hexano dan mejores rendimientos aunque económicamente solo son viables si se procesan diariamente más de 50 t de biodiésel [60].

Todavía se debe realizar un esfuerzo mayor para desarrollar procedimientos extractivos mediante fluidos supercríticos o disolventes renovables. La producción de combustible diésel a partir de aceites vegetales está bien documentada en la literatura, aunque para conseguir una producción eficiente desde el punto de vista económico se debe seguir investigando en la mejora de los procesos catalíticos, y sobre todo en el desarrollo de pequeños reactores, de bajo coste para la producción de biodiésel a pequeña escala. El aceite obtenido de las semillas de jatrofa puede usarse directamente o transformado en biodiésel dependiendo de su uso final y de la infraestructura existente [56].

Cuando realizamos procedimientos de extracción mecánica la torta que queda como subproducto, en el caso de que se haya usado el total de la semilla, contiene una riqueza de entre el 9-12% en aceite, y tiene un alto contenido en proteínas por lo que podría usarse como fertilizante, incluso hay estudios que afirman que la presencia de ésteres de forbol en la torta harían que esta pudiera ser simultáneamente usada como fertilizante y bioherbicida o bioplaguicida aunque los ésteres de forbol se descomponen completamente a los seis días. Así, la torta de las semillas es un subproducto importante ya que puede utilizarse para diversos propósitos, de hecho el reciclaje de los residuos como fertilizante puede contribuir a abaratar los *inputs* tanto para el cultivo de jatrofa como para otros cultivos, y la

producción de biogás a partir de la torta puede reducir el gasto energético del proceso [56].

Como conclusión de este apartado dedicado a jatrofa podemos decir, que si bien es cierto que se trata de un cultivo prometedor existen ciertas lagunas de conocimiento, sobre todo en lo que respecta a sus aspectos agronómicos, es decir, prácticas agrícolas así como los potenciales riesgos o beneficios medioambientales. En lo que concierne al rendimiento, existe mucha variación en los datos disponibles para casi todas las etapas de cultivo. Actualmente, es aún arriesgado concluir que este cultivo cumple los dos mínimos requisitos de cualquier fuente de energía que pretenda ser una alternativa a las fuentes de combustibles fósiles tradicionales

Principales inconvenientes de su cultivo:

Este cultivo presenta altos costes de mantenimiento derivadas de las prácticas encaminadas al aumento del rendimiento en frutos. Aunque la planta pueda sobrevivir y realizar su ciclo vegetativo con normalidad en condiciones semiáridas, el agua mínima necesaria equivale a 600 mm para conseguir una producción de semillas aceptable. Otro gravísimo inconveniente es la variabilidad en la maduración de sus frutos que implica un periodo de recolección muy largo y necesariamente manual, elevando los gastos de recolección.

1.4. Microalgas.

Como hemos afirmado anteriormente, existe en la literatura cierta confusión en lo que respecta a la clasificación del biocombustible proveniente del aceite de las microalgas, ya que algunos autores, así como la Agencia Internacional de la Energía, lo clasifican como un combustible de tercera generación [12,13], mientras que otros autores, lo engloban dentro

de la segunda generación debido a que procede de un cultivo no alimentario, y el proceso de transformación de su aceite en biodiésel sigue la misma tecnología que la utilizada en plantas oleaginosas [14,15].

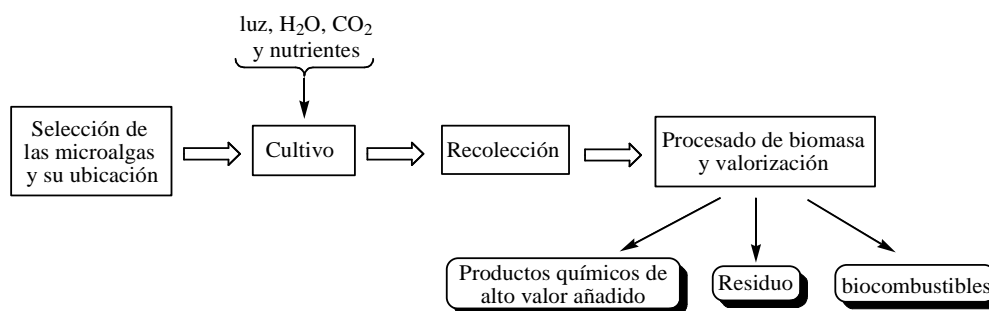
Las microalgas (*Botryococcus braunii* y *Chlorella vulgaris*, entre otras) son microorganismos fotosintéticos (procarióticos o eucarióticos), que pueden crecer rápidamente en condiciones extremas convirtiendo la luz solar, agua y CO₂ en biomasa, sin impactar negativamente en los suministros de alimentos u otros productos derivados de la agricultura. El porcentaje de aceite sobre peso seco de las microalgas puede alcanzar el 80%, mientras que los cultivos oleaginosos mencionados en los biocombustibles de segunda generación pueden alcanzar un contenido en aceite del 5% [61,62]. Como un ejemplo comparativo, se puede decir que para producir los 0.53 billones de litros anuales de biodiésel necesarios para sustituir el petróleo utilizado en los Estados Unidos, como equivalente al consumo actual de gasolina, se necesitarían cultivar 111 millones de hectáreas (el 61% de su superficie agrícola) de palma africana (uno de los cultivos oleaginosos más productivos); sin embargo, si pretendiésemos cubrir esa misma demanda con microalgas únicamente serían necesarias 5.4 millones de hectáreas, es decir, el 3% del total de la superficie cultivable, suponiendo un contenido medio en aceite sobre peso seco del 30% [63].

La composición del aceite obtenido, y en particular los triglicéridos, difiere según la especie de microalga y de las condiciones del medio de cultivo. Esta composición es importante ya que los triglicéridos muy instaurados no son adecuados para la producción de biodiésel.

En general, el crecimiento de la biomasa de estos microorganismos depende fundamentalmente de un suministro suficiente de carbono y luz

para la realización de la fotosíntesis, así como la presencia de sustratos, vitaminas, sales minerales y otros nutrientes. En las condiciones climáticas adecuadas y los suficientes nutrientes, las microalgas pueden crecer profusamente, llegando a doblar su tamaño en 24 h, o incluso en 3.5 h durante la fase exponencial del crecimiento. Así, un factor clave para el desarrollo de una tecnología de biodiésel basada en el aceite de microalgas es la elección del sistema correcto de cultivo. En principio, los sistemas cerrados tubulares son capaces de producir diariamente alrededor de 500 kg ha⁻¹ de biomasa, permitiendo un mejor control de algunos factores ambientales importantes en el crecimiento de esta biomasa, como la temperatura, pero necesitan un coste elevado. Actualmente, se emplean estanques abiertos, más económicos y fáciles de utilizar pero con las siguientes limitaciones: poca eficiencia en la captación de luz, pérdidas por evaporación y la aparición de contaminaciones por patógenos y otros organismos heterótrofos que pueden disminuir la productividad. Este último inconveniente es el más importante y podría paliarse mediante un incremento en la velocidad de crecimiento de las microalgas, o la utilización de los sistemas de estanque en circuito (*raceway pond*) en los que una suspensión de algas, agua y nutrientes están continuamente circulando. Las microalgas pueden asumir una gran variedad de metabolismos ya que son capaces de cambiarlo en respuesta a condiciones adversas del medio. El equilibrio entre los parámetros operacionales, incluyendo la concentración de O₂, CO₂, pH, salinidad e intensidad de luz, son vitales para su crecimiento; esto se consigue en los sistemas de estanque en circuito mediante un adecuado flujo turbulento debido a que previene la formación de gradientes nutricionales y la sedimentación de los mismos.

De la biomasa resultante se extraen, mediante disolventes orgánicos (generalmente hexano), los aceites apropiados para ser utilizados como biocombustibles, carbohidratos y proteínas. Al contrario de lo que ocurre actualmente, estos últimos componentes deberían aprovecharse en un proceso de tratamiento integral de la biomasa (concepto de *biorefinería*, Esquema 5) con la finalidad de conseguir una reducción en el coste de producción, puesto que este coste asciende a 600-700 dólares por tonelada, únicamente comparable al proceso de obtención de biodiésel a partir de aceites reciclados o de aceites crudos mediante la transesterificación ácido/base [64-66].



Esquema 5. Proceso simplificado de la utilización integral de la biomasa a partir de microalgas, adaptado de Chisti [61]

Como conclusión se puede decir que aunque el rendimiento en aceite de las microalgas es elevado, los requerimientos para el establecimiento y mantenimiento de la estructura necesaria elevan el coste de producción del aceite en bruto.

1.5. Plantas laticíferas

Algunas especies vegetales son capaces de convertir los carbohidratos en una mezcla de derivados hidrocarbonados llamados terpenos. Los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno C_5H_8 y en algunos

casos se pueden utilizar como combustibles. En la actualidad el árbol *Hevea brasiliensis* de la familia Euphorbiaceae se utiliza para la producción comercial de caucho, *cis*-1,4-poliisopreno, con una producción mundial de 5.3 millones de toneladas según datos de 1993, lo que correspondería a un rendimiento medio anual entre 400-1200 kg ha⁻¹. El caucho natural se obtenía a principios del siglo XX a partir del Guayule (*Parthenium argentatum*), una planta de la familia de Asteraceae [67].

En los años 70, Melvin Calvin basándose en los conocimientos adquiridos sobre la fotosíntesis (Nobel en 1961) centra su investigación en las plantas laticíferas, capaces de utilizar la luz solar como fuente de energía para biosintetizar contenidos elevados de compuestos hidrocarbonados de bajo peso molecular (inferior a 2000 Da). Estos compuestos, similares al petróleo crudo, podrían procesarse con la misma tecnología que el petróleo en una refinería convencional. Sus estudios se centraron en algunas especies pertenecientes a la familia Euphobiaceae (*E. lathyris* y *E. tirucalli*, entre otras) [67-71]. Además, el material genético de la planta puede ser manipulado para obtener altas productividades de biomasa o mejoras en sus características metabólicas que faciliten su transformación posterior. Coincidiendo con este periodo de los años 1970, Buchanan *et al.* [72] evaluaron más de 200 especies pertenecientes a 57 familias y 141 géneros, que podían ser cultivadas en los Estados Unidos por su potencial como productoras de compuestos hidrocarbonados y caucho. Estas plantas tenían un contenido en látex entre 0.1-7%, destacando *Cacalia atriplicifolia* y *Sassafras albidum* por producir anualmente 2000 kg ha⁻¹ de látex.

Volviendo a la familia Euphorbiaceae, cabe destacar que incluye alrededor de 2000 especies que abarcan desde pequeñas hierbas a grandes

árboles. Las plantas del género *Euphorbia* son muy diversas en cuanto a forma y tamaño, existiendo desde pequeños árboles y arbustos, a plantas herbáceas. Generalmente monoicas y anuales, bienales o perennes con hojas simples de ordinario alternas, verticiladas y sin estípulas. Las plantas de esta familia tienen una alta especialización en la inflorescencia, el ciatio, que agrupa a flores unisexuales en característicos pseudantos, y no suelen estar solitarios sino que forman cimas. Estos consisten en una flor central pistilada rodeada de cinco grupos de flores con estambres. La flor central femenina se abre antes que las masculinas, funcionando cada ciatio como una flor protógina hermafrodita. Las glándulas del ciatio producen néctar, y la polinización es principalmente zoófila [73]. En las latitudes templadas el biotipo más común es el de una hierba o mata foliosa, con tallos algo crasos y hojas simples. En los trópicos secos son matas suculentas espinosas, a veces de varios metros de altura, como en África, donde representan el equivalente ecológico a los cactus de los desiertos americanos. La mayoría de ellas producen un látex lechoso que ofrece una amplia variedad de componentes químicos tales como caucho, aceites, terpenos, alcoholes, alcanos, ácidos grasos, almidones, taninos y resinas de interés para varias industrias.

De entre todas las especies estudiadas, Calvin y sus colaboradores seleccionaron *E. lathyris* y *E. tirucalli* para establecer una plantación experimental en el sur de California. Se concluyó que *E. lathyris* es más resistente a las heladas y en 7 meses puede procederse a su recolección, alcanzando 1.5 m de altura, mientras que *E. tirucalli*, propagada vegetativamente a partir de estaquillas de 7-8 cm, necesita un año para su recolección y alcanzaba una altura de 60 cm. Ambas especies necesitan para

crecer una precipitación anual entre 250-500 mm y no necesitan suelos de buena calidad, con un proceso de recolección fácilmente mecanizada, algo esencial ya que influye en la rentabilidad del cultivo y por ende determina su potencial como alternativa al petróleo. Los estudios agronómicos realizados revelaron un rendimiento para *E. tirucalli* de 30 barriles ha^{-1} (aproximadamente 6000 L ha^{-1}) y para *E. lathyris* alrededor de 20 barriles ha^{-1} (casi 4000 L ha^{-1}) a partir de las plantas salvajes. Con la adecuada selección genética, el volumen de látex de *E. lathyris* podría duplicarse [71]. Posteriormente Ward [74] rebatió estos datos de productividad alegando que los experimentos de Calvin se realizaron con un número reducido de muestras, ya que solo se plantaron 250 plantas en un suelo extremadamente fértil y con suministro de agua de riego. Además, los datos recogidos, que sirvieron de base para la extrapolación de los resultados, correspondían a plantas situadas en los bordes de la parcela que generalmente dan mayores rendimientos que aquellas situadas en la zona central. Según Ward, en un suelo marginal con una precipitación anual máxima entre 50-200 mm, el rendimiento no superaría los 0.025 barriles ha^{-1} .

El procedimiento extractivo del aceite (tal y como denominó Calvin al extracto apolar de esas plantas) consistiría en la extracción en Soxhlet con hexano o diclorometano, seguido de una segunda extracción Soxhlet con metanol [75]. El material obtenido del extracto hexánico es un líquido viscoso de color oscuro, que recuerda al petróleo en crudo y en condiciones de craqueo se comporta de manera similar. El residuo metanólico consiste básicamente en azúcares.

Calvin en colaboración con *Mobil Corporation* realizó estudios de craqueo catalítico con zeolitas (ZSM-5) a partir de una muestra de aceite de

E. lathyris. Los mejores resultados obtenidos fueron en lecho fluido a 500°C, con una velocidad espacial horaria másica (WHSV, por sus siglas en inglés) de 0.4; y mostraron valores en porcentaje de coque relativamente aceptables y valores elevados en olefinas y aromáticos (Tabla 1) [76].

	Hidrocarbonados (%)	Distribución (peso, %)
C ₂ -C ₄ olefinas	21.7	10 (C ₂); 10 (C ₃); 2 (C ₄)
C ₆ -C ₉ aromáticos	45.5	8 (benceno); 19 (tolueno), 1 (éter butílico); 14 (xilano); 4 (otros)
C ₁ -C ₄ parafinas	5.2	-
C ₅ -C ₁₀ alifáticos	6.4	-
≥ C ₁₁	16.4	-
Coque	4.8	-

Tabla 1. Conversión de extractos de *E. lathyris* sobre ZSM-5 en un reactor de lecho fluido a 500°C y velocidad espacial por hora y gramo de catalizador (WHSV) de 0.4.

A finales de la década de los 70, Weizs *et al.* [77] estudiaron la conversión del caucho de *Hevea brasiliensis* en combustibles y *Mobil Research Co.* investigó también el uso de la zeolita ZSM-5. El proceso se ha probado con éxito para diversas clases de productos vegetales, como por ejemplo aceites de ricino o de maíz, o los ésteres de cadena larga del aceite de yjoba, que pueden ser convertidos eficientemente en productos químicos o incluso combustible [77]. Unos años más tarde se realizaron estudios similares en *E. neriifolia* [78] con un catalizador de Pd sobre soporte de sílica-alúmina con una presión de hidrógeno inicial de 5 MPa en un autoclave agitado de 1 dm³, a un intervalo de temperaturas entre 380-450°C, una presión entre 80-100 bares y con un ratio alimentación/catalizador 10:1. Este experimento dio una conversión del 72% a productos de más de 5 carbonos, un 17% serían gases (C₁-C₅) y coque, siendo el resto agua (11%). Los gases eran mayoritariamente metano

I. Introducción

(55%), etano (9.4%) y propano (6.2%) mientras que el *n*-butano y el *iso*-pentano eran menores del 1%. Los rendimientos de las fracciones de destilación del producto líquido fueron: 65-120°C, 30%; 120-150°C, 5%; 150-220°C, 5%; 220-260°C, 10%; 260-300°C, 10%; y >300°C, 40%. Esto sugiere que habría un rendimiento de conversión a gasolina del 35% y a keroseno del 15%. El producto líquido contenía: 50.2% de hidrocarburos aromáticos, 45% de hidrocarburos saturados y 4.8% de olefinas.

En 2008, Padmaja *et al.* [79] estudiaron la conversión del biocrudo de la *E. antisiphilitica* a distintas temperaturas y distintos ratios de carga/catalizador. El estudio fue realizado en un reactor de lecho fluidizado usando un catalizador comercial de FCC, obteniendo una máxima selectividad a destilados medios con ratios catalizador/carga (C/O, por sus siglas en inglés) de 4 y 6, y con temperaturas de 500°C. La mayor parte de los productos gaseosos obtenidos fueron C₃, C₄ y C₅. La composición de los combustibles líquidos resultantes tenía un alto contenido en hidrocarburos aromáticos y un bajo contenido en olefinas.

	Catalizador/alimento			
	3	4.02	6	7.02
	Rendimiento (peso, %)			
Gas seco	1.09	1.16	1.35	1.84
LPG	10.11	11.74	12.59	13.79
Gasolina	15.42	16.79	18.32	20.36
Destilados medios	57.14	59.9	59.80	56.62
370	13.40	7.27	3.59	3.03
Coque	2.84	3.14	4.33	4.35
% conversión	83.76	89.58	92.05	92.59

Tabla 2: Selectividad a productos en el cracking del biocrudo de *E. antisiphilitica* a diferentes ratios catalizador/carga (C/O) a 480°C, adaptada de Padmaja *et al* [79].

	Temperatura			
	460°C	480°C	500°C	520°C
	Rendimiento (peso, %)			
Gas seco	0.59	1.09	1.12	1.85
LPG	6.85	10.11	13.53	15.12
Gasolina	13.41	15.42	17.54	20.90
Destilados medios	60.11	57.14	59.89	55.63
370	15.41	13.40	4.22	2.60
Coque	3.62	2.84	3.68	3.88
% conversión	80.96	83.76	92.08	93.48

Tabla 3: Selectividad a productos en el cracking del biocrudo de *E.antisiphilitica* a diferentes temperaturas con C/O=3, adaptada de Padmaja *et al.* [79].

Actualmente, la tecnología permite mejorar los problemas derivados de la transformación del látex en combustible convencional, por lo que se debería insistir en la investigación agronómica para conseguir un cultivo con un rendimiento aceptable en látex por hectárea. Además, este rendimiento debería conseguirse en terrenos marginales con la menor aportación de insumos posible.

2. Antecedentes agronómicos

La intención del presente trabajo es seleccionar y definir los principales parámetros agronómicos de algunas plantas laticíferas, susceptibles de ser cultivadas en áreas mediterráneas como cultivos energéticos. El criterio principal a la hora de definir la idoneidad de una especie para su cultivo a gran escala, sea cual sea la utilización final de sus productos, es que pueda generar una producción aceptable con los menores insumos (*inputs*) posibles. Entre los gastos más importantes para cualquier cultivo destaca el agua de riego, por lo que si se pretende que el cultivo sea sostenible, es importante determinar la mínima cantidad de agua que maximice el rendimiento en biomasa por hectárea. Pero más allá de los criterios

económicos, los cultivos energéticos del futuro deberían respetar criterios de sostenibilidad medioambiental y social. La aplicación de estos criterios implica que los cultivos energéticos no deben competir en ningún aspecto con aquellos destinados a la producción de alimentos, por lo tanto la situación ideal es que este tipo de plantas deberían ser cultivadas en terrenos que se consideren no aptos para los cultivos alimentarios o donde los cultivos alimentarios den una productividad no aceptable. Esto implica que las plantas destinadas a ser fuentes de materias primas para la producción de biocombustibles habrán de soportar niveles de estrés abiótico elevados. En este sentido es importante destacar que el concepto de estrés abiótico implica alteración en el metabolismo celular, inducido por condiciones ambientales adversas, con efecto sobre la fisiología y desarrollo de las plantas incluyendo tanto la carencia de agua como la posibilidad de que la escasa agua de riego disponible tenga niveles elevados de sales, así como que el suelo de cultivo se presente con estructura y composición deficientes.

En la zona mediterránea los factores de estrés más importantes están relacionados principalmente con la escasez de agua, el tipo de suelo y la baja calidad del agua de riego, en muchas ocasiones extremadamente rica en sales. En algunas áreas geográficas, estas limitaciones impiden obtener unas cosechas aceptables, siendo pocas las especies capaces de ofrecer una productividad aceptable, y en muchas ocasiones no consiguiendo alcanzar un precio de mercado capaz de mejorar sustancialmente el nivel de vida de los agricultores.

Poco hay estudiado acerca de las características agronómicas de las plantas laticíferas como fuente de energía. Algunos investigadores estudiaron la productividad de *E. lathyris* en función del suministro hídrico

[80,81] aunque la gran parte de los estudios consultados, especulan sobre rendimientos potenciales pero hacen un estudio agronómico poco profundo [66-70] o se centran sobre todo en el aspecto químico-industrial de la producción de biocombustibles a partir del látex [74-79]. Desde nuestra modesta posición, nosotros pretendemos aportar luz sobre los aspectos agronómicos de la producción de biocombustibles a partir del látex de las plantas laticíferas.

2.1. El estrés hídrico en las plantas cultivadas

El estrés hídrico se produce en plantas cuando las condiciones ambientales impiden que la absorción de agua sea suficiente para reemplazar las pérdidas de la misma por transpiración [82]. Cuando la carencia de agua llega a producir un funcionamiento subóptimo de la planta se inducen determinadas respuestas frente a la deficiencia hídrica: marchitamiento de la hoja, que fundamentalmente conducen a una reducción del potencial hídrico, conductancia estomática, transpiración y asimilación de CO₂ [82-87]. Los regímenes de deficiencia hídrica severa causan una inhibición total del crecimiento vegetativo y abscisión de las hojas [88], que en el caso de las plantas cultivadas se traduce en un menor crecimiento y un descenso de la producción.

El principal mecanismo por el cual las plantas limitan la pérdida de agua por transpiración bajo condiciones de estrés hídrico es el cierre estomático [82,85-87,89-91] que, además de reducir el grado de estrés hídrico, también reduce la asimilación neta de CO₂ [83,84,86,87].

Hilgeman *et al.* [92] sugirieron que cuando existe una alta demanda evaporativa, el cierre de los estomas permite que las plantas puedan reducir el uso del agua y evitar el estrés. En respuesta al estrés hídrico, existen

diferentes estudios que muestran con detalle cómo el sistema radical envía señales a las hojas, en las cuales se induce el cierre estomático para evitar la pérdida de agua. Una de estas señales es la producción de ácido abscísico (ABA) en las raíces, el cual es transportado hasta las hojas a través del xilema [93-96]. También cambios en el pH de la savia del xilema o en el del apoplasto pueden estar implicados en la dinámica de los estomas en condiciones de estrés hídrico [97].

Además del cierre estomático, existen otras respuestas de la planta al estrés hídrico, entre ellas: el incremento del ratio raíz/parte aérea [98]; la reducción del número de hojas y del área foliar [99]; el ajuste osmótico que consiste en incrementar la concentración de solutos en hojas, permitiendo a éstas mantener la turgencia necesaria para que los estomas permanezcan abiertos y así mantener niveles adecuados de fotosíntesis [100,101]; el incremento de la actividad de enzimas relacionados con el estrés oxidativo en células de las hojas [102].

En el contexto concreto de las plantas laticíferas algunos autores coinciden en afirmar que estas plantas tienen sus propias estrategias para evitar la deshidratación [80,81] bien cerrando los estomas o bien mediante estrategias de ajuste osmótico [103]. En lo que a productividad se refiere, si bien se ha confirmado una relación positiva entre el agua disponible y el incremento en peso seco en *E. lathyris*, esto no se ha constatado en el caso del rendimiento en látex [81]. No se han realizado estudios exhaustivos de productividad de plantas laticíferas y menos en condiciones de falta de agua [66-70], y son escasos los trabajos que detallan la importancia del riego sobre la producción de látex de *E. lathyris*, tanto por gramo de planta como por hectárea cultivada [80, 81]. Es interesante destacar que no existen

estudios de este tipo para otras especies salvajes del género *Euphorbia* del área mediterránea.

2.2. La salinidad como factor limitante de la producción en las cultivadas

La salinidad afecta a la planta de muy diversas formas desde el punto de vista fisiológico. Se producen desórdenes fisiológicos que disminuyen el crecimiento y la producción, antes de que los daños morfológicos debidos a la presencia de sal sean evidentes. Generalmente, las especies leñosas presentan estos síntomas a concentraciones de sal más bajas que las plantas herbáceas [104]. Además de las alteraciones osmóticas que produce la acumulación de iones en los distintos tejidos, la salinidad provoca en última instancia desórdenes fisiológicos que se traducen en una progresiva disminución del crecimiento y una disminución del rendimiento en frutos en el caso de plantas cultivadas. En regiones de clima mediterráneo, además, se le suma en determinadas épocas del año una elevada demanda evaporativa y precipitación inadecuada, de manera que requieren de riego adicional para obtener cosechas económicamente viables. En estas áreas, muchos suelos y el agua utilizada contienen alta cantidad de sales, existiendo incluso intrusión de agua salada en regiones costeras que pueden inhibir el crecimiento y la producción [105-107].

A pesar de que la respuesta de la mayoría de las plantas a la salinidad depende del potencial osmótico total del agua del suelo sin importar el tipo de iones [108], muchas plantas herbáceas así como la mayoría de las leñosas son susceptibles a iones específicos, fundamentalmente de Na^+ y Cl^- [109, 110]. Adicionalmente, el estado hídrico de la planta se ve alterado por la salinidad debido al estrés osmótico, el cual impide la absorción de agua.

Estas alteraciones disparan mecanismos específicos que controlan el ajuste osmótico de la célula evitando la pérdida de agua [111]. Sin embargo, en el caso de estrés salino, la inhibición de la capacidad fotosintética puede llegar a ser más importante que el estrés osmótico y la reducción de la conductancia estomática en la limitación de la tasa de asimilación de CO₂ [112].

Se han realizado estudios sobre el comportamiento de las plantas laticíferas regadas con agua salina concretamente *E. tirucalli*, *E. antisiphilitica* y *E. lathyris* y todos parecen coincidir que estas plantas exhiben una cierta tolerancia a la salinidad, llegando incluso a registrarse un mayor crecimiento de la parte aérea en el caso de *E. antisiphilitica* [113], mientras que *E. lathyris* exhibió una menor tolerancia a la salinidad ya que ve afectado su sistema radicular a concentraciones moderadas [114]. Sin embargo, aparte de estos trabajos centrados en especies de *Euphorbia* abundantes en el subcontinente indio, no hemos encontrado estudios recientes sobre el efecto de la salinidad en las distintas especies de plantas laticíferas, autóctonas o naturalizadas en la región mediterránea.

2.3. El suelo como potencial limitante del desarrollo de los cultivos

Para el desarrollo correcto de todas las plantas se necesita un soporte físico así como la presencia de elementos esenciales, oxígeno y agua. El suelo va a proporcionar dichos elementos, siendo su capacidad para suministrarlos dependiente de sus características físicas y químicas.

Las características físicas de un suelo se hallan determinadas por su textura y estructura. La textura indica la distribución cuantitativa de las distintas partículas que componen el suelo clasificadas según su tamaño. Mientras que la estructura hace referencia a la posición relativa que ocupan

unas partículas respecto de otras en los distintos horizontes del suelo; así desde el punto de vista de su composición y teniendo en cuenta el tamaño de las partículas, los suelos se pueden clasificar en arcillosos y arenosos. En los suelos arcillosos (donde predominan elementos finos con buenas propiedades coloidales) y en arenosos (constituidos por partículas de mayor tamaño).

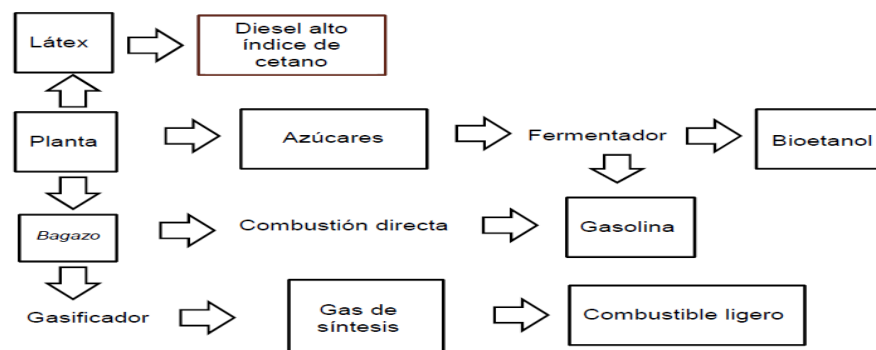
En áreas mediterráneas predominan suelos franco-arcillosos (lo que dificulta la circulación del aire y el agua además de aportar al conjunto del suelo una resistencia mecánica que hace que se desarrolle menos el sistema radicular de la planta; presentan como ventaja su gran capacidad de retención de agua y sus propiedades coloidales) y franco-arenosos (con poros grandes donde el agua y el aire circulan sin dificultad, pero por el contrario no tiene actividad química, ni cohesión ni plasticidad y sus partículas no tienen la capacidad de retención de agua que tienen las partículas arcillosas) con un alto contenido en cal que haría que tuvieran un pH de entre 8-8.5. El índice de acidez o basicidad del suelo influye no solo directamente en la planta a través de la alteración de muchas acciones enzimáticas e incluso la respiración, sino indirectamente alterando la textura del suelo, modificando su actividad biológica y condicionando la solubilidad de los compuestos. Así, en los suelos ácidos se solubilizan el Al, Fe y el Mn cuyas sales pueden llegar a ser tóxicas para la planta. Cuando el pH es elevado, la mayoría de cationes se insolubilizan, particularmente el Fe, Cu, Mn y el Zn, y el fosfato monocálcico se transforma en bi o tricálcico, también insolubles por lo que en estas condiciones la absorción de nutrientes se dificulta enormemente siendo muy frecuentes los síntomas de deficiencia.

A principios de los años 90 se publicaron diversos estudios sobre la adaptabilidad de diversas especies laticíferas, principalmente del género *Euphorbia*, a los diversos tipos de suelo. En 1990 Garg y Kumar concluyeron que los suelos arenosos maximizaban el rendimiento de *E. lathyris* tanto en peso seco como en látex [114], mientras que en otro estudio realizado sobre *E. antisyphilitica* se concluía que los suelos arcillosos favorecían el crecimiento lateral de la planta aunque eso no se traducía en un mayor peso en comparación con las plantas crecidas en suelos arenosos [113]. Se evidencia en algunos estudios que el mayor rendimiento tanto en peso seco como en peso fresco se obtiene en suelos ligeros [115]. Existen pocos estudios acerca de la relación entre suelo y crecimiento o rendimiento en látex de las plantas laticíferas más comunes en la región mediterránea.

En resumen, podemos afirmar que no existen estudios rigurosos sobre la influencia del estrés hídrico y/o salino, así como la estructura y composición del suelo sobre la producción de látex en la región mediterránea. Los escasos estudios existentes sobre el efecto de dichos factores son poco recientes y centrados en un número muy reducido de especies (*E. lathyris*, *E. antisyphilitica* y *E. tirucalli*), las cuales son poco habituales de la región mediterránea.

Las principales razones que nos han llevado a abordar el estudio de plantas laticíferas como potencial cultivo energético para terrenos marginales son:

1. Estos cultivos están muy adaptados a las condiciones climáticas de la región mediterránea, pudiendo crecer en suelos marginales, con la reducción que implica respecto al consumo en agua y fertilizantes.
2. La tecnología para la extracción es muy similar a la existente en la industria de los aceites.
3. La transformación del látex en biocombustible puede llevarse a cabo en una refinería convencional, quedando como residuo una fracción soluble en metanol, con un elevado contenido en azúcares fermentables, y un marco lignocelulósico (bagazo) también utilizable. Así, se puede hacer un aprovechamiento integral de la biomasa, tal y como se puede apreciar en el Esquema 6.



Esquema 6. Diagrama de aprovechamiento integral de las plantas laticíferas

Por todas estas razones, es fundamental realizar un estudio riguroso de este tipo de plantas, con la finalidad de optimizar las técnicas agronómicas que permitan obtener el mayor rendimiento por hectárea en compuestos

I. Introducción

susceptibles de ser transformados en biocombustibles. En los entornos mediterráneos además, debemos tener en cuenta que con veranos calurosos y secos los cultivos en ocasiones son regados con aguas de riego de mala calidad por lo que el éxito o fracaso de un cultivo energético vendrá dado en buena medida por su capacidad para soportar la salinidad y el estrés hídrico, así como su capacidad de crecimiento en los terrenos calizos. Así pues, ya que la tendencia actual en lo que a cultivos energéticos se refiere viene marcada por su adaptabilidad a terrenos marginales, hace necesario el estudio detallado de la respuesta de las distintas especies frente a las distintas condiciones ambientales propias de estas áreas geográficas.

II. OBJETIVOS

II- OBJETIVOS

El **objetivo principal** del presente trabajo consiste en la selección de una especie salvaje de plantas laticíferas y su evaluación como fuente de biocombustibles y otros productos de interés para la industria química, con el fin de un aprovechamiento integral del total de la planta (véase Esquema 6 de la Introducción).

Una vez seleccionada la especie y con la finalidad de llevar a cabo el objetivo mencionado anteriormente, nos hemos propuesto resolver los siguientes objetivos parciales químicos y agronómicos:

Objetivos parciales:

- a) **Determinar y cuantificar los metabolitos presentes en las plantas.**
Identificación y cuantificación de los compuestos extraíbles en n-hexano de esqueleto hidrocarbonado fundamentalmente alcanos, triterpenos, alcoholes y ácidos grasos que suelen encontrarse mayoritariamente en el látex. Así como la identificación y cuantificación de los compuestos extraíbles en metanol, fundamentalmente carbohidratos y similares.
- b) **Estudio de las condiciones agronómicas que maximizan el rendimiento de derivados hidrocarbonados** (mayoritarios en el látex), por unidad de superficie con el mínimo aporte de agua de riego.
- c) **Estudio de la tolerancia a la sequía y determinación de la dosis mínima de agua** que maximiza la producción del contenido en derivados hidrocarbonados (látex) por hectárea.

- d) **Estudio del rendimiento en el contenido de derivados hidrocarbonados por hectárea**, en las distintas condiciones edafológicas.

- e) **Efecto de la salinidad en el crecimiento y producción de compuestos hidrocarbonados**. Nivel de salinidad máximo que tolera la planta sin ser afectados sus parámetros fisiológicos, especialmente aquellos de interés agronómico.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de las especies. Screening botánico

Este estudio se inició con una selección previa de distintas plantas laticíferas existentes en nuestro entorno mediterráneo. Entre los meses de mayo y octubre de 2008, se eligieron varias plantas laticíferas preferentemente especies herbáceas o arbustivas como fuentes potenciales de biocombustible, con una productividad alta en biomasa y con un rendimiento superior al 5% (en peso seco) en compuestos hidrocarbonados extraíbles con n-hexano. Se estudiaron ecotipos salvajes de cinco especies diferentes, pertenecientes a las familias Euphorbiaceae y Apocynaceae, que crecen en clima mediterráneo seco en tierras tanto cultivadas (flora arvense) como marginales. Las especies estudiadas fueron: *E. nicaensis*, *E. segetalis*, *E. characias*, *Araujia sericifera*, *Lactuca serriola*.

1.1. Descripción botánica de las especies

A continuación se describen las especies estudiadas:

E. nicaensis subsp. *nicaensis*. Descripción botánica (Imagen 1): también conocida como lechetrezna común, es una planta sufruticosa, multicaule, con numerosos rebrotes que a veces llevan hojas arrosetadas en su extremo, es una hierba perenne, erecta, no ramificada y glabra. Tiene una altura de 20-50 cm, una base leñosa y es un caméfito, lo que significa que durante la época desfavorable mantiene yemas persistentes que se encuentran hasta 25-40 cm por encima del suelo. Sus tallos miden 3-5 mm de diámetro, suelen adquirir un color rosa rojizo y, a medida que van creciendo, van perdiendo las hojas de la parte baja, las cuales dejan unas cicatrices características. Tiene las hojas de color verde azulado o grisáceo. Como todas las plantas del género *Euphorbia*, tiene las flores muy

simplificadas y agrupadas formando una inflorescencia llamada ciatio, que funcionalmente es equiparable a una flor hermafrodita. Cada ciatio consta de una sola flor femenina central simplificada que posee un único pistilo, rodeada por un número variable de inflorescencias masculinas reducidas a un único estambre llevado por un pedúnculo. Todo este conjunto queda rodeado por un involucro formado por la soldadura de las brácteas de las inflorescencias masculinas. Florece de abril a julio. El fruto es una cápsula de entre 3 y 4.5 mm, que contiene 3 semillas de unos 2 mm y se abre de forma explosiva. Estas semillas son dispersadas por hormigas, que se las llevan para comerse la excrecencia carnosa de alto valor nutritivo que se conoce como *carúncula*. Es común en el arco mediterráneo y va asociada a los suelos calizos [71,116].

***E. segetalis* subsp. *segetalis*.** Descripción botánica (Imagen 2): conocida como lechetrezna fina. Su tallo mide unos 2-3 mm de grosor, es leñoso en su mitad inferior de donde salen cortas ramificaciones estériles y en su mitad superior forma una inflorescencia umbeliforme ancha, laxa y esbelta que alcanza los 40 cm de altura. Suele ser una hierba anual, raramente perennizante, de hojas lanceoladas estrechas de unos 25 x 3 mm o incluso más estrechas si se trata de ramas estériles. Las hojas presentan márgenes paralelos y punta aguda y la inflorescencia ciatios rodeados de brácteas florales ovato-trianguulares y anchas, en contraste con las hojas caulinares estrechas. Las flores poseen apéndices con cuernos estrechos y un ovario con tres lóbulos muy bien definidos. Fruto en cápsula lisa, con una banda estrecha en cada lóculo. Aparece en campos abandonados y secanos. En terrenos removidos, márgenes de cultivos y bordes de caminos [116].

***E. characias* subsp. *characias*.** Descripción botánica (Imagen 3): conocida como tártago mayor, es un arbusto perenne. Los tallos pueden alcanzar 150 cm, lignificados en la base, erectos y ramificados en su parte inferior (entre 8-35 ramas laterales fértiles, pelosas y generalmente purpúreas). Cuando se parten exudan una savia que es un látex lechoso blanco. Las hojas son de un color verde azulado lineales que pueden alcanzar los 10 cm de largo y 1 cm de ancho. Las hojas están más densamente situadas cerca de los extremos de los tallos pero más escasas ó ausentes cerca de sus bases. Son hojas lanceoladas, oblanceoladas o lineares, gruesas y consistentes, sésiles, pelosas y un verde oscuro por el haz y más claras por el envés. Poseen pleocasio con 9-20 radios hasta 3 cm y varias veces bifurcados y brácteas con ciatos con la finalidad de atraer a los insectos polinizadores. El ciatio contiene nectarios de color pardo-negruczo en forma de media luna. Estos racimos redondeados resaltan sobre el resto del follaje desde el principio de la primavera al principio del verano. Los frutos esféricos de 5 x 5 mm contienen las semillas 4 x 2 mm, elipsoideas y lisas de color gris. Aparece en la montaña, en claros de zonas forestales, en matorrales, caminos, laderas pedregosas o en el fondo de algunas ramblas [72].

***Lactuca serriola* L.** Descripción botánica (Imagen 4): especie perteneciente a la familia Compositae (Asteraceae). Es una planta anual, en ocasiones perennizante, rígida y robusta que puede alcanzar 2 m de altura, con ramas espinosas arriba. Hojas rígidas, con un margen muy lobulado y pequeñas espinas en el envés sobre el margen y el nervio central. Las hojas se retuercen en la base y se orientan de norte a sur. Los capítulos son pequeños de 1-1.5 mm de diámetro, con flores amarillas y forman una

inflorescencia muy ancha en la parte superior del tallo. Florece en verano y habita los márgenes de caminos, riberas secas y dunas. Es común en la mayor parte de Europa [117,118].

***Araujia sericífera* Brot.** Descripción botánica (Imagen 5): también conocida como Miraguano o Planta Cruel, pertenece a la familia Asclepiadaceae. Nativa de América del Sur. Es un subarbusto perennifolio que puede alcanzar los 8 m de altura. Presenta tallos volubles y pelosos. Sus hojas pecioladas pueden llegar a medir 7 x 4 cm, opuestas, oblongo-lanceoladas, con haz verde y subglabra, con envés blanquecino. Suele considerarse como una mala hierba. Sus cimas axilares presentan de 1-5 flores. Poseen brácteas lineares que pueden alcanzar 1 cm de longitud. Flores con pedicelos pelosos de 1-1.6 cm. Corola de casi 3 cm de diámetro. Folículo que puede alcanzar 12.5 x 5.5 cm. Tiene un rápido crecimiento de enredadera e invade los campos de naranjos, compitiendo con el árbol por la luz, el agua y los nutrientes. Actualmente, sólo pueden eliminarse de forma manual ya que no hay herbicidas eficaces contra esta especie [71].



Imagen 1. *E. nicaeensis* subsp. *nicaeensis*



Imagen 4. *Lactuca serriola* L.



Imagen 2. *E. segetalis* subsp. *segetalis*



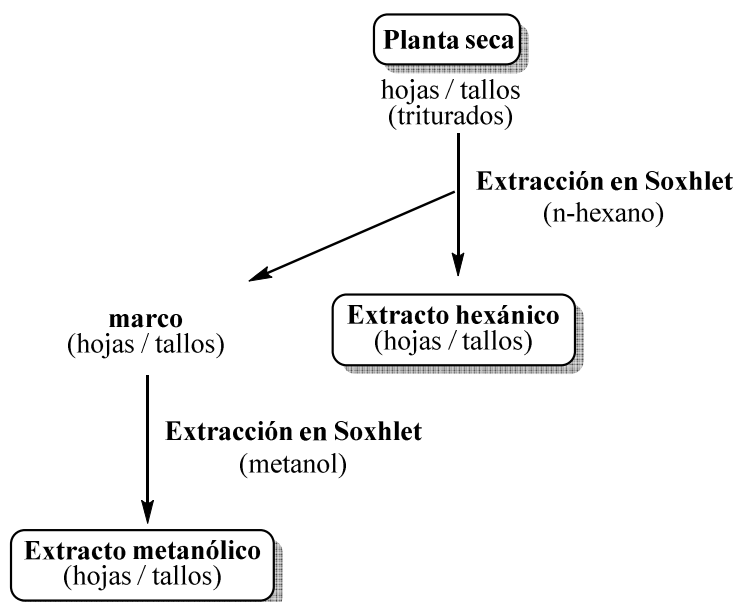
Imagen 5. *Araujia sericifera* Brot.



Imagen 3. *E. characias* subsp. *characias*.

1.2. Extracción en Soxhlet de las distintas especies

De cada especie se extrajeron los metabolitos contenidos mayoritariamente en el látex siguiendo el método descrito por Nemethy *et al* [119]. Consiste en secar las plantas en una estufa a 65°C hasta peso constante, y posteriormente someter a la planta seca a una extracción mediante aparato de Soxhlet durante 8 horas. Primero se utiliza un disolvente apolar, n-hexano (grado analítico, Scharlau SL, Barcelona), y a continuación se realiza una segunda extracción del marco (bagazo) con un disolvente polar, metanol (grado analítico, Scharlau SL, Barcelona). Se evaporaron los disolventes en rotavapor a presión reducida, obteniéndose para cada una de las plantas de las especies a evaluar, un extracto hexánico y un extracto metanólico tanto de hojas como de tallos (4 extractos por planta). Se hicieron entre 5-9 repeticiones por especie a estudiar.



Esquema 7. Procedimiento de extracción y análisis de los extractos según Nemethy *et al* [119]

2. Optimización del método extractivo de *E. characias*

Extracción en Soxhlet. Debido a la gran cantidad de muestras que se deben analizar en el presente trabajo, se decidió buscar las condiciones óptimas para el proceso extractivo. En base a datos bibliográficos, decidimos mejorar la metodología de extracción en Soxhlet descrita por Nemethy *et al.* [119] y aplicada previamente en nuestro proceso de selección de las especies. Se pretende encontrar un método eficiente, reproducible y fiable en lo que a tiempo, rendimiento y gasto en disolvente se refiere. Se realizaron entre 3-5 repeticiones de diversas pruebas de extracción con cada disolvente, hexano y metanol (grado analítico, Scharlau SL, Barcelona), para cada una de las partes aéreas de la planta (hojas y tallos).

Así, se estudió el rendimiento a distintos tiempos de extracción en Soxhlet de 2, 4 y 8 h, y dos tamaños de muestras distintos para una misma cantidad de disolvente (5 y 3 g de muestra en 50 mL de disolvente).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los resultados mediante el programa Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Inc., Warrenton, WA, EEUU). Este análisis nos mostró que para un mismo tamaño de muestra no existen diferencias significativas entre los distintos tiempos de extracción (2, 4 y 8 h) en el caso de la extracción con hexano, tanto en hojas como en tallos. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el caso de la extracción de tallos con metanol para los procesos de extracción durante 2 h respecto a las realizadas en 4 y 8 h. En vista de los resultados obtenidos y en base a datos bibliográficos de Adams y McChesney [120], decidimos aplicar un tiempo de extracción de 4 h tanto para el hexano como para el metanol, en hojas y tallos. Por otro lado, el ANOVA reveló que no existían

diferencias significativas de rendimiento con dos tamaños de muestra distintos (5 y 3 g en 50 mL de disolvente). Así, se estableció la metodología de extracción de 4 h y 5 g de muestra seca en 50 mL de disolvente. Una vez realizadas las extracciones en Soxhlet con hexano y metanol, se evaporaron los disolventes en rotavapor a presión reducida, obteniendo los extractos hexánico y metanólico.

3. Estudio metabolómico de ecotipos salvajes de *E. characias*

Disolventes y reactivos. El compuesto utilizado como patrón interno, tetracosano, los compuestos de referencia apolares: ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico, fitol, 1-hexacosanol, 1-octacosanol, escualeno, nonacosano, hentriacontano, tritriacontano, lupeol, β -sitosterol, lanosterol, cycloartenol, así como el agente sililante *N,O*-Bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co. (St Quentin Fallavier, France). El hexano, acetato de etilo, diclorometano (CH_2Cl_2), tetrahidrofurano (THF) y metanol (MeOH) procedían de laboratorios Scharlau SL (Barcelona). Todos los disolventes eran de grado HPLC o UPLC, excepto el hexano y metanol utilizados en las extracciones que eran grado analítico.

Material vegetal. Se recolectaron plantas salvajes pertenecientes a *E. characias* de tres entornos geográficos distintos de la Comunidad Valenciana durante el periodo de verano, concretamente la cuarta semana de los meses de julio y septiembre de 2009. Todas las plantas se encontraban en el mismo estado vegetativo, con la finalidad de averiguar si existían diferencias en los rendimientos de extracto hexánico y metanólico debido a factores geoclimáticos propios de cada zona.

III. Material y Métodos

Las zonas de recolección de plantas salvajes se detallan a continuación:

- Sierra de Mariola (Agres, Alicante)
- Sierra de Espadán (Almedíjar, Castellón)
- Comarca de l'Alt Maestrat (Culla, Castellón)



Imagen 6. Mapa de localización de las zonas de recolección de plantas salvajes con sus correspondientes coordenadas UTM (*Universal Transverse Mercator*).

III. Material y Métodos

Análisis del suelo de las diferentes localizaciones. En las tres localizaciones, se tomaron muestras de suelo de tres puntos diferentes. Se seleccionaron para cada población tres grupos representativos de plantas que fueron tomadas como punto central de una circunferencia de 10 m de radio, delimitándose de ese modo una subparcela circular. Una vez delimitada la parcela se extrajo la tierra de cuatro puntos situados en el borde de la circunferencia trazada, y distantes entre sí un mínimo de 5 m mezclándose la tierra de cada grupo. Se procedió de la misma forma con el resto de grupos. Las muestras fueron analizadas obteniéndose los datos que se detallan a continuación:

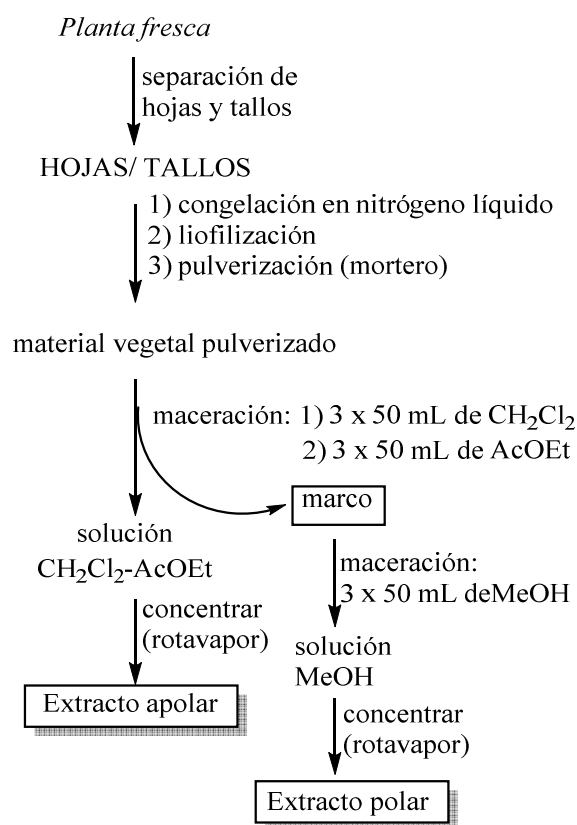
	S. de Mariola	S. de Espadán	L'Alt Maestrat
% Arcilla	14.80	10.70	23.00
% Limo	22.20	20.40	47.91
% Arena	63.00	68.90	29.09
% de mat. org.	3.53	1.30	2.82
% carbonatos	37.01	23.00	45.00
% caliza activa	7.10	3.00	9.00
pH	8.20	7.80	7.80

Tabla 4. Análisis de suelo de las tres localizaciones estudiadas.

Extracción por maceración. A partir de la planta fresca (1.5 g) se separaron hojas y tallos. Las partes aéreas de la planta se trataron con nitrógeno líquido y se liofilizaron. Las muestras liofilizadas se pulverizaron utilizando una maza y un mortero [121]. A continuación, 0.5 g de muestra pulverizada y liofilizada se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se extrajeron durante 20 min con 25 mL de disolvente mediante maceración a temperatura ambiente. Se utilizó diclorometano y acetato de etilo (3 veces con cada disolvente). Los extractos orgánicos se filtraron, combinaron y se evaporaron hasta aproximadamente 1 mL, mediante un equipo de rotavapor a presión reducida (Buchi, Labortechnik,

III. Material y Métodos

Suiza). Esta disolución de 1 mL de extracto orgánico se filtró con un filtro de jeringa de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0.45 μm (Fischer Scientific, Inc., Dreieich, Alemania). El filtrado se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno, y los residuos secos de los extractos se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis metabólico. Siguiendo este mismo proceso, el marco se reextrajo con metanol (3 x 25 mL). Este proceso de maceración se realizó por triplicado para cada muestra (Esquema 8).



Esquema 8. Esquema de extracción en fresco de metabolitos en plantas laticíferas

Purificación de los metabolitos. Algunos derivados hidrocarbonados de estructura triterpénica presentes en los extractos se aislaron e identificaron

III. Material y Métodos

previamente en el laboratorio del CEQA, para identificarlos y utilizarlos posteriormente como compuestos de referencia.

Muestras (0.5 g) de hojas y tallos de los extractos hexánicos procedentes de la Sierra de Espadán y de l'Alt Maestrat, se disolvieron en metanol (10 mL) y se centrifugaron a 4000 rpm. El sobrenadante de cada muestra se secó y el residuo se purificó por cromatografía en columna *flash* de silica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck, Darmstadt, Germany) o bien mediante cromatografía *flash* de media presión (CCMP) en un aparato Biotage SP1 (Biotage Inc., Charlottesville, VA, EEUU) equipado con una columna preempaquetada (Si 25+M) y acoplado a un detector de longitud de onda fija (λ 254 nm), En ambos casos, se usó un gradiente de 100% hexano hasta 100% acetato de etilo y se trabajó a un flujo 3 mL min⁻¹. Se obtuvieron entre 10-12 fracciones a partir de cada muestra de extracto.

Posteriormente, algunas fracciones obtenidas de los extractos de hojas y tallos se inyectaron en un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) semipreparativo Waters 600E system (Milford, MA, EEUU) con bomba de inyección de disolvente Waters 600E, y acoplado a un detector de *Photodiode Array* (Waters 2996 PDA) y un detector *Evaporative light-scattering* (Waters 2420 ELSD). En este caso, la separación de metabolitos se llevó a cabo con una columna Kromasil 100 C18 (10 x 250 mm, 5 μ m) de Teknokroma (Barcelona, Spain) y a una temperatura de columna de 22°C. Se utilizó una elución isocrática con 100% MeOH y un flujo de 3 mL min⁻¹.

Resonancia magnética nuclear (RMN). Cada uno de los extractos hexánicos se disolvió en una porción de CDCl₃ (ca. 0.6 ml) y se sometió a análisis de RMN de ¹H y ¹³C en un Bruker AV 300 MHz, Bruker AVIII 500

MHz o AVII 600 MHz con criosonda. Los multipletes de las señales de ^{13}C se asignaron mediante experimentos de distorsión por polarización de transferencia (DEPT, por sus siglas en inglés).

Derivatización de los extractos hexánicos. Los derivados trimetilsilil (TMS) de los metabolitos presentes en el extracto hexánico (5 mg) se prepararon mediante la adición de 100 μL de CH_2Cl_2 anhidro y 100 μL de BSTFA al 1% TMCS a un vial ambar de CG de 1.5 mL [122]. La reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió una solución de patrón interno (0.2 mg mL^{-1} de tetracosano en CH_2Cl_2) hasta alcanzar 1 mL y las muestras se analizaron mediante GC-MS.

Identificación de metabolitos del extracto hexánico. La identificación de los metabolitos mayoritarios de ambos extractos se llevó a cabo a partir de muestras previamente derivatizadas (sililación) y sin derivatizar. Los compuestos se identificaron fundamentalmente por comparación del tiempo de retención (t_R) y el patrón de fragmentación obtenido de los cromatogramas de espectrometría de masas con muestras estándar, comerciales u obtenidas mediante purificación previa en el CEQA.

En el proceso de identificación se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) conectado a un espectrómetro de masas (GC-MS, PerkinElmer Clarus 500 gas chromatograph, Shelton, EEUU) operando en modo de impacto electrónico (energía de ionización 70eV y temperatura de la fuente de ionización de 300°C) y equipado con una columna capilar ZB-5 MS (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). Rango de m/z entre 55-600. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 mL min^{-1} . Las muestras (derivatizadas y sin derivatizar) se inyectaron con un *autosampler* a una

III. Material y Métodos

temperatura de 250°C, el cual inyectaba en la columna 1 µl de muestra en modo split (ratio: 4:1, flujo: 5 mL min⁻¹). La rampa de temperaturas fue la siguiente: iniciamos en 110°C, 25°C min⁻¹ hasta 210°C, 10°C min⁻¹ hasta 260°C y finalmente 4°C min⁻¹ hasta 340°C sostenidos durante 5 min. El software utilizado para la identificación fue TurboMassVer5.2.0 (PerkinElmer, Inc., Norwalk, CT, EEUU).

Cuantificación de los metabolitos en los extractos hexánicos. La cuantificación de los metabolitos del extracto hexánico se hizo mediante un GC con detector de ionización de llama (GC-FID, PerkinElmer Clarus 500 gas, Shelton, CT, EEUU), equipado con una columna capilar ZB-5 MS (30 x 0.25 mm x 0.25 µl) (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU), equivalente a la utilizada en GC-MS. La temperatura FID fue de 300°C. Se inyectó 1 µL de las muestras sin derivatizar con un *autosampler* en un inyector split/splitless, programado en modo split (ratio: 19:1; flujo: 20 mL min⁻¹) a 250 °C. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. El programa de temperaturas fue el mismo que el utilizado para el GC-MS. El programa usado en el análisis y procesado de datos del GC fue TotalChrom Workstation Ver6.2.1 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, EEUU). Se utilizaron las ecuaciones de regresión lineal, obtenidas a partir de curvas de calibración de los metabolitos, previamente identificados con el espectrómetro de masas.

Para el análisis de las muestras de extractos hexánicos, se inyectaron en el equipo GC-FID 25 mg de muestra disueltos en 5 mL de disolución de patrón interno (0.2 mg mL⁻¹ de tetracosano en CH₂Cl₂). Las curvas de calibrado nos permitieron saber los mg de metabolito por g de peso seco de

cada una de las partes aéreas de la planta. El procedimiento se realizó por triplicado (n= 3).

Curvas de calibrado. Se construyeron por triplicado curvas de calibración para cada uno de los metabolitos identificados, inyectando en GC-FID seis concentraciones diferentes (20, 40, 100, 200, 500 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), disueltas en una disolución de patrón interno (0.2 mg de tetracosano en 1 mL de CH_2Cl_2). Para cada análisis, las respuestas a tener en cuenta eran la relación entre el área del pico de analito y del patrón interno (y). Se representaron en una gráfica la relación de áreas (y), frente a la relación de concentraciones de analito y patrón interno (x). La ecuación obtenida se ajustó a un modelo de regresión lineal de la forma ($y = a + bx$), donde $y = A_{\text{analito}}/A_{\text{pi}}$; $x = \text{Conc}_{\text{analito}}/\text{Conc}_{\text{pi}}$. Los coeficientes de correlación (r^2) de las curvas de calibrado mostraron valores entre 0.97 y 1.

Análisis de datos. Las muestras de los extractos hexánicos (hojas y tallos) obtenidos mediante maceración en los meses de julio y septiembre de 2009 de ecotipos salvajes se analizaron para cada localización. La cuantificación se realizó por triplicado y se expresó como medias \pm errores estándar (SE) de mg de metabolito por g de parte aérea de planta seca. Las concentraciones de metabolitos calculadas como mg por 1g de peso seco de parte aérea de planta, se representaron en una matriz de análisis multivariante para el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en ingles) para analizar las posibles diferencias entre las distintas poblaciones y para analizar también la influencia de los principales metabolitos en estas diferencias. Se utilizó el programa estadístico Matlab Ver6.1 (the MathWorks, Inc., Natick, MA, EEUU). Previamente, los datos

para construir el PCA se normalizaron utilizando el método de escalado Pareto.

El PCA nos proporciona dos matrices que nos permiten elaborar gráficos que ayudan a interpretar los resultados: la matriz de puntuaciones (*score plots*) y la matriz de carga (*loading plots*). La matriz de puntuaciones (*scores*) expresa los datos originales transformados en los valores de las componentes principales. La matriz de cargas (*loadings*) contiene los coeficientes de las transformaciones lineales de variables originales que dan lugar a una determinada componente principal. Los llamados *score plots* muestran las tendencias de agrupamiento que hay entre los datos, que relación existe entre las distintas concentraciones de metabolitos y si hay valores altamente atípicos.

4. Estudio metabolómico de *E. characias* cultivada

Disolventes y reactivos. Los siguientes reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co. (St Quentin Fallavier, France): el patrón interno utilizado en el estudio del extracto hexánico (tetracosano), los compuestos de referencia apolares (ácido palmítico, ácido linoleico, ácido linolénico, fitol, 1-tetracosanol, 1-hexacosanol, 1-octacosanol, escualeno, heptacosano, nonacosano, hentriacontano, tritriacontano, lupen-3-ona, lupeol, β -sitosterol, lanosterol y cycloartenol), los patrones internos utilizados en el estudio del extracto metanólico (D-(+)-trehalosa y flavanona), los compuestos de referencia muy polares (D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, sacarosa, myo-inositol, ácido cítrico, ácido D-(+)-málico, ácido L-piroglutámico, ácido L-aspártico, L-glutamina; y compuestos polares: quercetin-3- β -glucósido, quercitrin y quercetin), así como también los agentes sililantes *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoro-acetamida (BSTFA), BSTFA al 1% en

III. Material y Métodos

trimetilclorosilano (TMCS), e hidrocloreuro de metoxiamina. El hexano, acetato de etilo, CH₂Cl₂, THF y MeOH procedían de laboratorios Scharlau SL (Barcelona). Todos los disolventes eran de grado HPLC o UPLC, excepto el hexano y metanol utilizados en las extracciones que eran grado analítico

Material vegetal y extracción en Soxhlet. Se recolectaron de cada parcela de estudio entre 3-6 plantas de *E. characias* por tratamiento de irrigación (1-3 y control). Se secaron en una estufa a 65°C hasta peso constante (48 h). Se separaron hojas y tallos de cada planta y se pulverizaron mediante un molinillo. El material pulverizado (5 g) se extrajo en un aparato de Soxhlet mediante n-hexano durante 4 h, seguido de una segunda extracción con metanol durante otras 4 h, siguiendo el protocolo establecido en el apartado 2 de Material y Métodos.

Extracción en fase sólida (solid phase extraction, SPE) del extracto metanólico. Muestras de extracto metanólico (50-80 mg) se filtraron a través de un cartucho ExtraBond C₁₈ (1 g, 6 mL, Scharlau S.L., Barcelona), previamente preacondicionado con metanol (3 x 6 mL) y H₂O destilada (3 x 6 mL). Primero, se eluyó la muestra con H₂O (2 x 6 mL) recogiendo los compuestos más polares (fracción SPE1), principalmente mono- y disacáridos. A continuación, la muestra se eluyó con metanol (2 x 6 mL) para recuperar los compuestos menos polares retenidos (fracción SPE2), principalmente flavonoides [123]. Ambas fracciones SPE1 y SPE2 se concentraron en rotavapor a presión reducida.

Identificación de los metabolitos del extracto hexánico y metanólico.
Análisis GC-MS. La identificación de los metabolitos mayoritarios de ambos extractos se llevó a cabo a partir de muestras previamente

derivatizadas (sililación). Al igual que en el apartado 3 de Material y Métodos, se compararon los t_R y el patrón de fragmentación de los metabolitos con muestras estándar, comerciales o purificadas en el CEQA, algunas de las cuales habían sido previamente derivatizadas.

Los compuestos apolares del extracto hexánico se identificaron mediante el equipo de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (PerkinElmer Clarus[®] 500 gas chromatograph, Shelton, CT, EEUU) operando en modo de impacto electrónico y equipado con una columna capilar ZB-5 MS (30 m × 0.25mm × 0.25 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). La temperatura del horno se programó a 90°C durante 1 min, se incrementó 20°C min⁻¹ hasta 210°C, y 10°C min⁻¹ hasta 260°C, para finalmente aumentar 4°C min⁻¹ hasta 340°C durante 10 min. Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL min⁻¹. Un *autosampler* inyectó 1 μL-muestra en un inyector split/splitless a 250 °C, que operaba en modo split (split ratio: 9:1; flujo de split: 10 mL min⁻¹). La temperatura de la interfase de CG se fijó a 250°C. La energía de electrones 70eV y la temperatura de la fuente de iones a 180°C. La adquisición del espectro de masas se realizó utilizando una monitorización de scan completa, con un rango de masas m/z 55-600, a una velocidad de 0.2 scans s⁻¹. Los datos se recogieron y procesaron en el software TurboMassVer5.2.0 (PerkinElmer Inc., Norwalk, CT, EEUU).

Los compuestos polares del extracto metanólico se identificaron utilizando el mismo equipo de GC-MS y operando en las mismas condiciones descritas anteriormente. La temperatura del horno se programó a 110°C durante 1 min, se aumentó 10°C min⁻¹ hasta 210°C, se incrementó 5°C min⁻¹ hasta 260°C, y entonces 4°C min⁻¹ hasta 340°C durante 5 min. Se

utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL min⁻¹. El inyector split/splitless operó en modo de split (split ratio: 29:1; flujo de split: 30 mL min⁻¹).

Derivatización del extracto apolar (hexánico). Los extractos hexánicos se derivatizaron (TMS) siguiendo la metodología del apartado 3 de Material y Métodos [122]. A las muestras derivatizadas (5 mg), se les añadió una solución de patrón interno (0.2 mg mL⁻¹ de tetracosano en CH₂Cl₂) hasta alcanzar 1 mL y se analizaron mediante GC-MS.

Derivatización del extracto polar (metanólico). Los derivados TMS de extracto metanólico (5 mg) se obtuvieron mediante un proceso de 2 etapas que implicaba un proceso de metoximación-trimetilsililación. Para la reacción de metoximación, se pesó una muestra de extracto metanólico (5 mg) en un vial ámbar de gases, se trató con una solución de hidrocloreuro de metoxiamina (20 mg mL⁻¹ en piridina) (100 µL) y se agitó toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, se añadió BSTFA al 1% TMCS (100 µL) como agente sililante y se agitó durante 3 h a temperatura ambiente [124]. Después, se redisolvió el vial con 1 mL de CH₂Cl₂ y se analizó mediante GC-MS.

Análisis UPLC-PDA-Micromass Q-TOF. Se realizó un análisis de alta resolución ESI-MS de los residuos de las fracciones menos polares (fracción SPE2, principalmente flavonoides) mediante un espectrofotómetro Micromass Q-TOF acoplado a un sistema Acquity UPLC-PDA (Waters, Milford, MA, EEUU) a través de ionización por electrospray (ESI). La separación se realizó en una columna de Waters Acquity BEH (150 x 2.1 mm i.d., 1.7 µm). El sistema de disolventes fue ácido fórmico al 0.1 % en

III. Material y Métodos

acetonitrilo (fase A) y agua ultrapura al 0.1 % en ácido fórmico (fase B). Las condiciones de gradiente fueron: 100% B a 0 min durante 1 min hasta 55% A en 30 min, mantenido durante 2 min, y volviendo a 100% B en 1 min, y equilibrando durante 2 min antes de la siguiente inyección; el flujo fue de 0.4 mL min^{-1} ; la temperatura de la columna y la muestra fueron 40°C y 20°C , respectivamente; el volumen de inyección de la muestra fue $2 \mu\text{L}$. El espectro de UV se adquirió entre 210 y 500 nm con una resolución de 1.2-nm y una velocidad de muestreo de 20 puntos s^{-1} . La fuente ESI operó en modo de ionización negativo con voltajes de capilar y cono de 3 kV y 45 kV, respectivamente. La temperatura de la fuente y la desolvatación se fijó a 120°C y 300°C respectivamente. Los flujos del gas del cono y desolvatación (nitrógeno) fueron 500 L h^{-1} y 50 L h^{-1} . La energía de colisión se fijó a 5eV. La adquisición de datos ESI se recogió en modo Centroides en un rango de scans completo de ratio masa-carga [m/z] 50-1500 y 0.2 s por scan. El espectrómetro de masas se calibró utilizando una mezcla PEG de peso molecular entre 200 a 1500 (la especificación de la resolución de 5000 FWHM, desviación $< 5 \text{ ppm RMS}$ en presencia de una masa conocida). Todos los datos se adquirieron usando un software MasslynkTM NT4.1 (Waters Corp., Milford, MA, EEUU).

Cuantificación de metabolitos apolares por análisis GC-FID. El contenido de cada metabolito de los extractos hexánicos se cuantificó utilizando un PerkinElmer Clarus[®] 500 gas acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) (Shelton, CT, EEUU) equipado con una columna ZB-5 MS ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$). La temperatura del FID se fijó a 300°C . Se trabajó en las mismas condiciones de programa de temperaturas y de flujo del gas portador (helio) que para el análisis en GC-

MS. Un *autosampler* inyectó 1 μL -muestra en un inyector split/splitless a 250 °C, operando en modo split (split ratio: 19:1; flujo de split: 20 mL min^{-1}). Las muestras (10 mg) de extracto hexánico sin derivatizar se disolvieron en 1 mL de solución de patron interno (0.2 mg mL^{-1} de tetracosano en CH_2Cl_2) y se inyectaron en el sistema de GC-FID. Las curvas de calibración externas permitieron calcular el porcentaje (%) de cada metabolito en el extracto hexánico. Los datos se recogieron y procesaron con un software TotalChrom Workstation (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, EEUU). Este proceso se repitió por triplicado con diferentes muestras (n= 3).

Cuantificación de carbohidratos por análisis HPLC-ELSD. A partir del extracto metanólico, una muestra (5 mg) de la fracción de residuos más polar obtenida por C_{18} SPE (SPE1, 100% H_2O) se redisolvió en 1 mL de solución de patron interno (trehalosa a 5 mg mL^{-1} en H_2O), y se inyectó en un equipo de HPLC (Waters 600E system, Milford, MA, EEUU) equipado con una unidad de bomba Waters 600E acoplado a un detector *evaporative light-scattering* (Waters 2420 ELS Detector). La separación de los carbohidratos se realizó mediante una columna ProntoSIL 120-3-amino (125 x 4.6 mm, 3 μm tamaño de partícula) (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany). Se eluyó en isocrático con una fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (90:10) y un flujo de 1 mL min^{-1} .

Cuantificación de flavonoides por análisis UPLC-PDA. A partir del extracto metanólico, una muestra (5 mg) de la fracción de residuos menos polar obtenida por C_{18} SPE (SPE2, 100% MeOH) se redisolvió en 1 mL de solución de patron interno (flavanona a 5 mg mL^{-1} en metanol), y se inyectó en un equipo Waters Acquity UPLC (Milford, MA, EEUU) equipado con una bomba binaria (solvent manager), un compartimento de columna y un

III. Material y Métodos

detector PDA 2996, conectado a un software Waters Masslynx Ver4.1. La separación de flavonoides y glicósidos se llevó a cabo utilizando una columna Waters BEH C18 (2.1×100 mm, $1.7 \mu\text{m}$) a 37°C . Las condiciones cromatográficas óptimas se encontraron con el siguiente sistema de disolventes: fase A, ácido fórmico al 1% en acetonitrilo y fase B, ácido fórmico al 1% en agua con un sistema de separación en gradiente de 100% B a 0 min durante 1 min hasta alcanzar un 55% A en 30 min; la velocidad de flujo de 0.4 mL min^{-1} y un volumen de inyección de $5 \mu\text{L}$.

Curvas de calibración externas. Se construyeron por triplicado curvas de calibración para los analitos polares y no polares a diferentes concentraciones (25, 100, 200, 500, 1000, $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los analitos no polares, polares SPE2 y muy polares, SPE1, se disolvieron en una solución de tetracosano en CH_2Cl_2 (0.2 mg mL^{-1}), trehalosa en H_2O (5 mg mL^{-1}) y flavanona en metanol (1 mg mL^{-1}), respectivamente, siguiendo el protocolo establecido en el apartado 3 de Material y Métodos.

Análisis de datos. Se analizaron las muestras de la parte aérea de la planta (hojas y tallos) de los extractos hexánicos y metanólicos para cada periodo y en cada tratamiento de irrigación (1-3 y control). Se calcularon por triplicado los contenidos de metabolitos como porcentaje de cada compuesto (media) en cada uno de los extractos y se ajustaron una matriz de análisis multifactorial (two-way ANOVA) con el programa Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Inc., Warrenton, WA, EEUU). Las medias se compararon utilizando el método LSD (*Least Significant Differences*) a un nivel de confianza del 95 %.

5. Estudio agronómico de *E. characias* cultivada

Material vegetal. Las semillas de *E. characias* que se emplearon para este estudio se recolectaron en primavera de 2010 a partir de plantas salvajes que crecían en el parque natural de la Sierra de Espadán, en el término municipal de Almedíjar (Castellón).

5.1. Ensayo 1: Estudio de la respuesta a diferentes dosis de riego

Condiciones de cultivo. Una vez crecidas las plantas en los semilleros, en primavera de 2011 se trasplantaron a 24 estructuras hexagonales de 3.8 m² de superficie y 0.9 m de profundidad situadas en las instalaciones del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Moncada) y conteniendo tierra procedente de parcelas de los campos de cultivo situados dentro de las instalaciones. En cada hexágono se plantaron 16 plantas con un marco de plantación de 0.4 x 0.4 m, implicando una densidad de plantación de 62500 plantas por hectárea y aportando 80 mm de agua para el buen establecimiento de la plantación.



Imagen 7. Aspecto general de las plantas de *E. characias* una vez trasplantadas al lugar de ensayo. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada), abril de 2011.

III. Material y Métodos

La tierra se analizó por el laboratorio agroambiental de Applus, Sidamón (Lérida) y se determinó una textura franco arenosa con un pH 8.4 (moderadamente alcalina) y con un porcentaje del 18% en carbonatos, de los cuales el 5% son caliza activa y el 0.86% de materia orgánica.

Para analizar el comportamiento de la planta frente a los diferentes niveles de estrés hídrico se dividieron los 24 hexágonos en grupos de 6 y a cada grupo se le asignó un tratamiento de riego distinto. Se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Cálculo de la capacidad de campo. Para determinar el volumen de agua a aportar por riego, el primer paso fue calcular la capacidad de campo del suelo, ya que se decidió que la dosis de riego máxima por unidad de superficie debía al menos reponer el agua perdida cuando la humedad en los 30 primeros centímetros de suelo fuera inferior al 60% de la capacidad de campo. Así, con la ayuda de unos cilindros metálicos se tomaron muestras de suelo a diferentes profundidades (0-20 cm, 20-40 cm y 40-60 cm). Partimos de la hipótesis de que la humedad está un 3% por debajo de la capacidad de campo por lo que, teniendo en cuenta el volumen de los cilindros, añadimos 50 mL de agua desionizada. A continuación se taparon los cilindros con una bolsa de plástico para evitar pérdidas de agua en la superficie y se dejaron reposar 48 h. Transcurrido ese tiempo, se tomó una pequeña muestra de unos 130 g para cada una de las capas y se determinó su humedad secándola al aire y en estufa.

Se determinó que la densidad del suelo era de 1.58 g cm^{-3} y que la capacidad de campo del suelo se alcanza cuando el porcentaje de humedad peso/peso alcanza el 14.5 %, que corresponde al 22.8% en peso/volumen. Con esto y puesto que, como hemos dicho anteriormente, decidimos que la

humedad en el tratamiento de mayor riego no debía descender por debajo del 60% de la capacidad de campo, el riego se aplicó cuando la humedad de los hexágonos sometidos al tratamiento de mayor volumen de agua llegue a 8.7% (p/p) o 13.7 % (p/v) en los 30 primeros centímetros de suelo. Por lo tanto y teniendo en cuenta estos resultados, por cada 100 kg de tierra se aportaron 5.8 L de agua. En los 30 primeros centímetros de suelo el peso de la tierra fue de 1800 kg ($3.8 \text{ m}^2 \times 0.30 \text{ m} = 1.14 \text{ m}^3 \times 1580 \text{ kg m}^{-3} = 1800 \text{ kg}$) por lo que se aportaron 104.4 L de agua para reponer el agua perdida. Vistos estos resultados, se decidió que las dosis de agua por riego en los hexágonos sería de R0 (control), 7.5 mm (30 L, R1), 15 mm (60 L, R2) y 30 mm (120 L, R3).

Control de la humedad del suelo. Para controlar el nivel de humedad del suelo nos ayudamos de la técnica de reflectometría de dominio de frecuencia (FDR, por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en la introducción de una sonda, también conocida como sonda de capacitancia, que tiene un sensor con unos circuitos que oscilan con una frecuencia que depende de la capacitancia del suelo, determinada por θ_v . La sonda porta sensores a diferentes profundidades y la magnitud medida es la θ_v a diferentes profundidades (en nuestro caso cada 10 cm). El sistema puede ser conectado vía cable a un ordenador. Tienen una precisión media del 5% aunque en calibraciones muy precisas para un suelo específico pueden llegar a ser del orden del 1%. El equipo que utilizamos fue la Sonda Diviner 2000 (Sentek Sensor Technologies, Stepney, Australia) que es un sistema portátil de medición de la humedad del suelo por FDR y que consiste de una unidad de visualización de datos y de una sonda portátil que mide el contenido de humedad en el suelo a cada intervalo uniforme de 10 cm a través del perfil

III. Material y Métodos

abarcando un radio de 10 a 15 cm desde la pared externa del tubo, expresándose los registros de humedad en % de peso/volumen. Los indicadores se leen a través de la pared de un tubo de acceso de PVC con graduaciones. El tubo es totalmente hermético y tiene un diámetro que encaja perfectamente con el sensor de la sonda. Instalamos 12 tubos (3 tubos por cada uno de los tratamientos de irrigación) tomando la precaución de que las paredes externas del tubo estuviesen en contacto completo con el suelo en todo su perímetro. El tubo está provisto en su parte superior de una tapa para evitar que cualquier material pueda introducirse en el interior. Semanalmente se tomaron medidas de contenido en humedad del suelo de los hexágonos y se procedió a regar cuando la media de las lecturas de la sonda era inferior a 13.7 % (60% de la capacidad de campo) para los 30 primeros centímetros de suelo en los hexágonos de mayor riego.

Para comprobar el estado fisiológico de la planta en respuesta a los diferentes niveles de estrés hídrico se realizaron las siguientes pruebas: medidas de potencial hídrico y medidas de intercambio gaseoso.

Medidas de potencial hídrico. El movimiento del agua entre los tejidos y los diversos espacios que constituyen una planta está gobernado por diferencias de potencial hídrico. El potencial hídrico de un tejido vegetal determina la dirección e intensidad del movimiento del agua en relación con el ambiente de la planta y será siempre negativo (pues se ha asignado al agua pura -sin solutos- un potencial hídrico igual a 0), tanto más cuanto mayor sea la concentración de solutos por lo que el tejido que posea un potencial hídrico bajo alejado de cero (es decir, muy negativo), tenderá a absorber agua de su entorno, siempre que éste presente un potencial hídrico más elevado próximo a cero (es decir, menos negativo).

III. Material y Métodos

Cada dos semanas aproximadamente se seleccionaron 4 hojas por cada uno de los tratamientos, correspondiendo cada una de ellas a una planta diferente y a un hexágono diferente. Esta medición se realiza al mediodía, escogiéndose de cada una de las plantas seleccionadas la cuarta hoja, empezando a contar desde el extremo superior del tallo.

Las hojas, inmediatamente después de ser recogidas, se metieron en botes de plástico y éstos en una nevera portátil para evitar pérdidas de humedad. Posteriormente y en el menor tiempo posible se trasladaban a la cámara de presión. El proceso de medición que seguimos fue el siguiente: colocamos la hoja en la cámara de presión (Soil Moisture Equip. Corp. mod 5100^a, Goleta, EEUU) haciendo sobresalir el peciolo a través de un tapón de goma que cierra la cámara. Aumentamos la presión en el interior de la cámara progresivamente (con nitrógeno) hasta que mediante una lupa se comienza a observar la salida de la savia, expulsada de las células de la superficie de corte del peciolo. En este momento, la presión alcanzada en la cámara será la presión de equilibrio con el potencial del xilema. Para una mayor precisión de las medidas se tuvieron en cuenta las recomendaciones de Turner [125] y Hsiao [126]: se realizó un corte único y limpio en el peciolo de la hoja, tras lo cual se procuró que la pérdida de humedad de la hoja cortada fuera mínima, reduciendo al máximo el intervalo de tiempo transcurrido entre el corte de la hoja y su medición y almacenando las hojas cortadas en una nevera portátil con hielo durante el trayecto de la parcela de experimentación al laboratorio. Ya en el laboratorio, la hoja se colocó en la cámara dejándose sobresalir de la misma solo la longitud mínima del peciolo para conseguir una buena lectura. La inyección de gas fue lenta y regular para lograr un buen equilibrio entre las diferentes partes de la hoja y

se evitó la pérdida de gas en la cámara para lograr una presión de equilibrio estable y una lectura fiable.

Medidas de intercambio gaseoso. La transpiración (E), la tasa neta de asimilación de CO₂ (A_{CO₂}), la conductancia estomática (gs) y la concentración subestomática de CO₂ (C_i) se midieron con un equipo portátil de fotosíntesis (CIRAS-2) (PP-systems, Hitchin, UK), equipado con una fuente externa de luz para mantener una radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés) constante. Previamente se realizó una curva de saturación de la fotosíntesis neta en función del PAR, para ello y por triplicado se sometió a una hoja a distintas intensidades de luz, determinándose que el valor máximo de la fotosíntesis se dio entre 1000 y 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por lo que el PAR en la superficie de la hoja se ajustó a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para realizar las medidas, la hoja se introdujo en la cámara PLC 6(U) y permaneció a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con un déficit de presión de vapor de 1.7 Pa. El flujo de aire a través de la cubeta fue de 0.5-1.5 L min⁻¹.

Para minimizar las variaciones de E, A_{CO₂}, gs y C_i, estos parámetros se midieron entre las 10:00 y las 12:00 h en días soleados. Se escogieron 5 plantas para cada uno de los tratamientos de riego y de cada una de ellas, se escogieron tres hojas completamente expandidas situadas en la parte más baja del tercio superior del tallo. La media de estas medidas se consideró como valor representativo de cada tratamiento.

Seguimiento del crecimiento y evolución del contenido en compuestos apolares (constituyentes hidrocarbonados) y polares (carbohidratos). En la última semana de los meses de octubre, diciembre, febrero, marzo, abril, mayo y septiembre se realizó el seguimiento del crecimiento de la planta,

III. Material y Métodos

calculando para ello el peso fresco y peso seco de la planta (y por lo tanto, del contenido en humedad).

Para ello se eligieron al azar un mínimo de 4 plantas por tratamiento, cada una de un hexágono diferente. Las plantas se cortaron dejando 2 cm de tallo por encima del suelo para asegurar el rebrote y se determinó su peso fresco. Posteriormente se secaron en una estufa a 65°C hasta peso constante (48 h).

Paralelamente, en los muestreos de los meses de diciembre y abril (coincidiendo con los periodos fisiológicos de prefloración y plena floración), y en el mes de septiembre (periodo de postfloración), se realizó un análisis cuantitativo del contenido en constituyentes hidrocarbonados y carbohidratos. Las plantas se secaron y se separaron hojas y tallos, éstos se pesaron y trituraron para posteriormente efectuar el mismo procedimiento de extracción en Soxhlet descrito anteriormente en el apartado 2 de Material y Métodos.

Análisis de fibras. El contenido total de nitrógeno se determinó mediante el método de micro-Kjeldahl y el contenido de proteínas se calculó como el contenido en nitrógeno x 6.25. Los contenidos en fibra detergente neutra (FDN), fibra ácido detergente (FAD), lignina detergente ácida (LDA) se determinaron siguiendo el método descrito por Van Soest *et al.* [127] utilizando una amilasa termoestable (Thermamyl L120, Novo Nordisk, Gentofte, Denmark), y el contenido en materia seca y cenizas se determinó según los métodos de la AOAC [128]. Cada análisis se repitió por triplicado sobre el marco (bagazo) de hojas y tallos, después de haber realizado las extracciones en Soxhlet con hexano y metanol. Las muestras analizadas incluían plantas sometidas a distintos riegos (R1-R3) y las plantas control

(R0), para cada uno de los tres estados de desarrollo de la planta. Mediante estos análisis se estableció el porcentaje de lignina, hemicelulosa y celulosa que queda en el residuo (bagazo).

5.2. Ensayo 2: Estudio de la respuesta ante diferentes estreses abióticos

El objetivo de esta experiencia fue determinar la tolerancia de *E. characias* a tres condiciones adversas del medio: la sequía, la alcalinidad del suelo y la salinidad.

Para los distintos ensayos se sembraron plantas obtenidas en un semillero en el mes de abril en contenedores con el suelo en sazón y, posteriormente, se les aplicaron los distintos tratamientos hasta finales de octubre. En este momento se arrancaron las plantas y después de desecadas se pesaron independientemente las hojas, los tallos y las raíces. Posteriormente, se determinó el contenido en extracto hexánico y metanólico, es decir, compuestos hidrocarbonados y carbohidratos, respectivamente, de las hojas y los tallos. En cada experimento se midieron los parámetros de intercambio gaseoso (conductancia estomática y transpiración) y contenido en clorofila, fluorescencia y asimilación neta de CO₂, así como las relaciones hídricas y el contenido en algunos elementos minerales (N, Fe, Cl⁻ y Na⁺).

5.2.1. Estudio de la respuesta frente al déficit hídrico

Mediante este ensayo se pretendió estudiar las respuestas fisiológicas de esta especie ante un estrés hídrico intenso y determinar su capacidad de resistencia a la falta de agua. Para ello se separaron dos grupos de contenedores, uno de los cuales se mantuvo sin aporte de agua, cubriéndolos con un plástico para evitar la lluvia; el otro se regó cuando el nivel de humedad del suelo medido con una sonda capacitométrica descendía

III. Material y Métodos

aproximadamente en un 40% de la capacidad de campo a 30 cm de profundidad. Esto supuso la aplicación de dos riegos posteriores durante el periodo experimental, que se aplicaron a finales de julio y de septiembre. Periódicamente y tal y como se hizo en el apartado anterior, se determinaron los correspondientes parámetros fotosintéticos, se realizaron las medidas de potencial hídrico y se determinó el contenido en extracto hexánico y metanólico de las plantas. Los valores de los diferentes parámetros se calcularon por triplicado ($n=3$) y se dispusieron en una matriz adecuada para el análisis de varianza (one-way ANOVA).

Determinación de las relaciones hídricas en hoja. Con periodicidad quincenal se realizaron las correspondientes medidas de potencial hídrico, arrancándose tres hojas representativas de la parte inferior del tercio superior del tallo de tres plantas representativas de cada tratamiento. El potencial hídrico (Ψ_w) se midió en las mismas condiciones y con la misma metodología que en apartados anteriores. Se determinó también el potencial osmótico (Ψ_o) para lo cual, en el mismo momento en que se determinó Ψ_w , se tomaron dos muestras de cada planta. Cada muestra estaba compuesta por, al menos, dos hojas. Las muestras se envolvieron en papel de aluminio y se congelaron a -20°C . Las hojas se descongelaron en el momento de la determinación del Ψ_o y se extrajo el jugo celular con una jeringuilla, del cual se determinó el Ψ_o a $25\pm 1^\circ\text{C}$ con un osmómetro (Digital Osmometer, Wescor, Logan, UT, EEUU). La media de las medidas de las dos muestras de cada planta se consideró como representativa de cada planta individual. El potencial de turgencia (Ψ_p). Se calculó como la diferencia entre el Ψ_w y el Ψ_o .

Contenido relativo de agua. Para la determinación del contenido relativo de agua (RWC) se arrancaron otras tres hojas de tres plantas representativas de cada tratamiento y se determinó su peso fresco (PF). Las hojas, por la parte del pecíolo, se introdujeron en un vaso en contacto con agua destilada durante 24 h en oscuridad para hidratar las hojas completamente. Las hojas se secaron con toallas de papel y se repesaron para obtener el peso en turgencia (PT). Después de pesar, se secaron a 80°C durante 48 h para obtener el peso seco (PS). El contenido relativo de agua de las hojas (RWC) se determinó como $RWC = \frac{(PF-PS)}{(PT-PS)} \times 100$ de acuerdo con Morgan [129]. La media de las medidas de cada tratamiento se consideró como representativa de cada planta individual.

Seguimiento del crecimiento y evolución del contenido en compuestos apolares (constituyentes hidrocarbonados) y polares (carbohidratos). Al final del experimento se determinó el peso seco final por partes (hojas, tallos y raíces) de cada una de las plantas para los tratamientos de riego (R) a capacidad de campo (CC) y no riego (NR). Siguiendo la metodología ya descrita en el apartado 5.1 de Material y Métodos se determinaron los rendimientos de los extractos hexánicos y metanólicos. Los valores de los diferentes parámetros se expresaron como la media de tres medidas.

5.2.2. Estudio de adaptación al suelo y tolerancia a la clorosis férrica

La presencia de nódulos calizos en el suelo es un elemento limitante en muchos cultivos. En muchos terrenos marginales del este de la península, los nódulos calizos son un elemento presente. Debido a que la idoneidad de un nuevo cultivo energético vendría marcado en gran medida por su facilidad de crecimiento en terrenos calcáreos, se decidió evaluar el comportamiento de la planta de *E. characias* frente a la cal. Para ello, se

III. Material y Métodos

dispusieron 48 macetas y se hicieron cuatro grupos de 12 macetas, conteniendo cada maceta 35 kg de tierra. A cada grupo de macetas le correspondió un tipo de tierra distinta. Se buscaron cuatro tipos de suelo típicos del este peninsular teniendo uno de ellos un alto contenido en cal. Según el análisis de suelos, el primer suelo recogido en una parcela del término municipal de la Vall d' Uixò, presentaba una textura franco-arenosa (24.4% de arcilla, 30.4 % de limo y 45.2% de arena) y un pH de 8.6 (moderadamente alcalino) con un contenido en carbonatos del 38 % y del 8 % en caliza activa. El segundo suelo tenía textura franco-arcillosa (27.3% de arena, 34.6 % de limo y 38.1 % arcilla) con un pH 8.4 (moderadamente alcalino) con un porcentaje del 36 % en carbonatos, de los cuales el 4 % son caliza activa. El tercer suelo era de textura franco-arenosa (14.8 % de arcilla, 22.2 % de limo y 63 % de arena) con un pH de 6.3 % y una cantidad inapreciable de carbonatos y caliza activa. El último suelo presentaba una textura franco-arenosa con porcentajes de arena, limo y arcilla respectivamente de 16.5 %, 29 % y 54.5 %, un pH ácido de 6.5 y un contenido inapreciable tanto de carbonatos como de caliza activa.

A principios de junio de 2011 se plantaron 48 plantas de idéntico peso y estado fisiológico en sendas macetas que previamente, tal y como hemos dicho anteriormente, habíamos dividido en cuatro grupos de 12 plantas según el suelo que contenían. Se dejaron crecer las plantas en las macetas durante 12 meses suministrándoles únicamente agua de riego de forma periódica. En junio de 2012 se arrancaron las plantas (3 plantas por tratamiento) y tras determinar para cada una de ellas su peso seco, su humedad (por diferencia entre peso fresco y peso seco) y el peso de cada una de las partes aéreas de la planta se sometieron a extracción con un

aparato Soxhlet por el mismo procedimiento descrito en el apartado de 2 de Material y Métodos. Se extrajeron también las raíces de las plantas determinándose su peso seco.

En las semanas previas a la finalización de este experimento se realizaron una serie de determinaciones que detallamos a continuación:

Medidas de fluorescencia de la clorofila. Se seleccionaron cinco hojas por tratamiento correspondientes a plantas diferentes y se cubrieron con papel de aluminio dejándose en oscuridad durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron las medidas de fluorescencia de la clorofila (Fluorímetro Portátil de Clorofila PAM-2100 Walz, Alemania) determinándose para cada una de las hojas los valores de la F_0 , F_m , y el ratio F_v/F_m . El valor de la fluorescencia basal (F_0) se obtuvo excitando los fotosistemas con un débil rayo de luz emitido por un diodo, mientras que la fluorescencia máxima (F_m), se determinó tras someter a la hoja a pulsos de 600 ms de luz blanca saturante.

Determinación del contenido en clorofila. Se seleccionaron tres hojas por tratamiento para la extracción de la clorofila. Las muestras se lavaron, secaron y cortaron en fragmentos circulares de 7 mm de diámetro. Posteriormente se pesaron 50 mg de estos fragmentos que se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL totalmente tapado con papel de aluminio al que posteriormente se le añadieron 6 ml de *N,N*-dimetilformamida (99.8%, Scharlau SL, Barcelona, España). Los matraces se dejaron reposar en nevera a 4°C durante 48 h [130], transcurrido este tiempo se trasvasaron las disoluciones a tubos Falcon para centrifugar a 4°C durante 15 min a 4000 rpm, con el fin de separar el extracto de clorofilas de los restos de material

vegetal. Una vez decantado el sobrenadante, se le añadió sulfato sódico anhidro para deshidratar la solución y se dejó reposar 1 h.

Durante todo el proceso de extracción, el material empleado estuvo envuelto en papel de aluminio para evitar que la luz entrara en contacto con la muestra y produjera la degradación de las clorofilas. Las absorbancias de los extractos se determinaron en un espectrofotómetro UV-VIS (Lambda 25, PerkinElmer Inc., Waltham, EEUU) a 647 y 664 nm de longitud de onda, usando cubetas de cuarzo. La calibración del equipo se realizó con un blanco de *N,N* dimetilformamida. Se realizaron dos lecturas de cada extracto.

Para el cálculo de la concentración de la clorofila a, b y total, se siguió las ecuaciones propuestas por Moran [130]:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 12.64\cdot A_{664} - 2.99\cdot A_{647}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = -5.6\cdot A_{664} + 23.26\cdot A_{647}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 7.04\cdot A_{664} + 20.27\cdot A_{647}$$

Donde A_{647} y A_{664} corresponden a las lecturas de absorbancia a 647 y 664 nm del extracto de clorofilas.

Medidas de intercambio gaseoso. La transpiración (E), la tasa neta de asimilación de CO_2 (A_{CO_2}), la conductancia estomática (gs) y la concentración subestomática de CO_2 (C_i) se midieron con periodicidad durante las últimas semanas del experimento en las mismas condiciones y con la misma metodología que en el apartado 5.1. de Material y Métodos.

5.2.3. Estudio de tolerancia a la salinidad

Para determinar la tolerancia a dosis crecientes de sal se cogieron 18 macetas de 35 L de volumen cada una (idénticas a las usadas en el ensayo

III. Material y Métodos

anterior) y se hicieron tres grupos cada uno con seis plantas adultas del mismo tamaño en el mismo momento del ciclo vegetativo, y elegidas al azar. A dos de esos tres grupos se les suministró una dosis determinada de agua salinizada con cloruro sódico (NaCl, Sharlau, Barcelona) mientras que el tercer grupo se regó con agua no salina. Las dosis de sal en cada uno de los tratamientos fue de 100 y 200 μM . Teniendo en cuenta que el peso molecular del cloruro sódico es 58.5 g mol^{-1} las cantidades de sal por 1 L de agua que se administraron en cada uno de los tratamientos fueron las siguientes:

- a) 100 μM : $5.85 \text{ g NaCl L}^{-1}$
- b) 200 μM : $11.75 \text{ g NaCl L}^{-1}$

Así pues, se dispusieron 4 bidones de 100 L de agua cada uno, aportándose a cada uno de ellos la cantidad de sal correspondiente; se regó cada una de las macetas de cada grupo con 5 L del agua salinizada, a la dosis de sal previamente determinada. Esta operación se llevó a cabo en plantas adultas semanalmente durante tres semanas a finales de junio de 2012, repitiéndose la salinización durante dos semanas a principios de septiembre y una vez a principios de octubre.

Medidas de intercambio gaseoso. Se realizaron medidas de los principales parámetros fotosintéticos (apertura de los estomas, transpiración y asimilación neta de CO_2) al final del experimento de igual forma que en el ensayo del apartado 5.2.1 de Material y Métodos. Se escogieron tres hojas completamente expandidas situadas en la parte más baja del tercio superior del tallo de cada una de las 6 plantas para cada uno de los tratamientos.

Determinación de las relaciones hídricas en hoja. Al final del experimento se midió el potencial hídrico (Ψ_w) y el potencial osmótico (Ψ_o) de la misma forma que en el apartado 5.2.1 de Material y Métodos, calculándose el potencial de turgencia (Ψ_p) como la diferencia entre los dos anteriores.

Determinación de Cl^- y Na^+ . Se tomaron tres muestras de hojas de cada una de las plantas del experimento. Las hojas se lavaron y se pesaron, se secaron en estufa a 65°C durante 48 h y, una vez secas, se volvieron a pesar.

Para el análisis de Cl^- , las hojas se trituraron y la muestra triturada se almacenó a temperatura ambiente. La concentración de cloruro se determinó siguiendo el método descrito por Gilliam [131] mediante valoración con electrodo de plata, empleando un clorímetro automático Corning-926 (Corning, Halstead, Essex, UK). Para cada planta, la determinación de cloruros se repitió al menos cinco veces, y se calculó la media.

Determinación del peso final y evolución del contenido en compuestos apolares (constituyentes hidrocarbonados) y polares (carbohidratos). Al final del experimento se arrancaron todas las plantas y se determinó el peso seco final de las hojas, los tallos y las raíces. También se realizaron extracciones con Soxhlet para evaluar las diferencias en el rendimiento en extracto hexánico y metanólico de hojas y tallos, siguiendo la metodología habitual descrita en apartado 2. de Material y Métodos.

5.3 Análisis estadístico de *E. characias* cultivada

Todos los resultados presentados en este experimento corresponden a la media y desviación estándar (en su caso) de un mínimo de tres réplicas ($n=3$) obtenidas a partir de grupos independientes de plantas por

tratamiento. El análisis estadístico se efectuó mediante análisis de la varianza con Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs, NJ). Se utilizó en los resultados un modelo de Las medias se compararon utilizando el método LSD (*Least Significant Differences*) a un nivel de confianza del 95 %. El contenido de metabolitos de las muestras así como el contenido de fibras, se determinó para cada periodo (fase I, II y III) y tratamiento de dosis de riego (R1-R3 y control R0). Estos contenidos se expresaron como porcentaje de cada compuesto por 100 g de peso seco. Se llevó a cabo un análisis de ANOVA de dos factores (two-way ANOVA) considerando el periodo y la dosis de riego, estudiando también las interacciones. Se representaron los residuos de cada modelo de ANOVA en un gráfico de probabilidad normal, y se encontró que los residuos seguían prácticamente una distribución normal. En muy pocos casos se identificaron uno o dos valores extremos y el ANOVA se repitió después de la eliminación de tales valores anormales. Mientras que los estudios de la respuesta ante los diferentes estreses abióticos (sequía, adaptación al suelo, tolerancia a la clorosis férrica, y salinidad) se analizaron utilizando el ANOVA de un factor (one-way ANOVA).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Selección de las especies. Screening botánico.

Esta investigación se inició con un estudio químico previo de algunas especies representativas de plantas laticíferas existentes en nuestro entorno mediterráneo: *Euphorbia nicaensis*, *E. segetalis*, *E. characias*, *Araujia sericifera*, *Lactuca serriola*. Se recogieron muestras estas especies determinándose su rendimiento en compuestos apolares (compuestos hidrocarbonados de cadena larga) por peso seco de parte aérea de la planta extraíbles en hexano, así como su rendimiento en compuestos polares (mayoritariamente azúcares) solubles en metanol. A continuación, se realizó el análisis elemental de los extractos hexánicos y metanólicos de las plantas con la finalidad de determinar el contenido porcentual de cada elemento (C, H, N, S y O) en dichos extractos.

La extracción de los compuestos apolares hidrocarbonados (mayoritarios en el látex), se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Nemethy *et al.* [74,119]. Utilizando un aparato de Soxhlet durante 8 h con n-hexano, seguido de una segunda reextracción del marco (bagazo) con metanol. Mediante el disolvente apolar (hexano), se extrajeron principalmente los constituyentes hidrocarbonados que presentan un alto valor calórico (aprox. 42×10^3 KJ Kg⁻¹) y un bajo contenido en metabolitos oxigenados [74]. Mediante el disolvente polar (MeOH), se extrajeron los componentes más polares, mayoritariamente metabolitos oxigenados tipo carbohidratos.

Una primera selección de las especies de plantas como fuentes potenciales de biocombustible se basó en los resultados químicos de los extractos: rendimiento de extracto hexánico (%) y análisis elemental (%); así como su potencial agronómico. En vista de los resultados obtenidos

IV. Resultados y Discusión

(Tabla 5), las especies elegidas fueron *E. characias* y *A. sericifera*. Posteriormente, esta última especie se descartó debido a los problemas asociados a su cultivo y proceso de recolección derivados de su naturaleza de planta trepadora y enredadera. El proceso de triturado era costoso en tiempo y problemático, debido a la estructura excesivamente fibrosa de sus tallos que se enredaban fácilmente en los rotores de la maquinaria (trituradora) dejándolos prácticamente inservibles en poco tiempo.

Especie	Ext. hexánico (%)*	Análisis elemental (%)
<i>E. segetalis</i>	4.29 ^b	C, 76.9; H, 12.0; O, 10.9; N, 0.3
<i>E. nicaeensis</i>	4.77 ^b	C, 76.6; H, 12.6; O, 10.6; N, 0.3
<i>E. characias</i>	7.02 ^a	C, 77.4; H, 11.7; O, 10.5; N, 0.4
<i>L. serriola</i>	3.29 ^b	C, 74.2; H, 11.4; O, 14.3; N, 0.2
<i>A. sericifera</i>	5.25 ^{ab}	C, 75.7; H, 11.8; O, 12.2; N, 0.3

Tabla 5. Resultados del screening previo de distintas especies, donde $n= 5-9$ (número de plantas estudiadas de la especie en cuestión); el rendimiento hexánico medio se calculó como la media aritmética de cada una de las n medias ponderadas de hojas y tallos para cada una de las especies.

2. Estudio metabolómico de ecotipos salvajes de *E. characias*

De las cinco especies estudiadas, *E. characias* mostró un elevado rendimiento en extracto hexánico, considerándose una fuente potencial de biocombustible. Por este motivo se procedió a su estudio, incluyendo: (i) el rendimiento de los extractos, y (ii) el perfil metabolómico del extracto hexánico.

Se recolectaron plantas pertenecientes a esta especie de tres entornos geográficos distintos de la Comunidad Valenciana: Sierra de Espadán, L'Alt Maestrat y Sierra de Mariola. El estudio químico se llevó a cabo durante el periodo de verano (meses de julio y septiembre), que coincide con el estado de desarrollo vegetativo de la planta y en el cual, según estudios

bibliográficos, debe presentar un menor contenido de agua y mayor proporción de compuestos apolares hidrocarbonados (alcanos, triterpenos, alcoholes grasos, etc) [132]. Todas las plantas recolectadas presentaban el mismo estado de desarrollo, con la finalidad de encontrar diferencias únicamente en función de los factores geoclimáticos de cada zona tanto a nivel de rendimiento de los extractos como en el perfil de metabolitos.

Rendimiento de extractos. Mediante la previa extracción en Soxhlet se determinó el rendimiento de los extractos de plantas salvajes en diferentes poblaciones y diferentes épocas del año, siguiendo el protocolo optimizado y establecido en el apartado 2 de Material y Métodos.

Los rendimientos del extracto hexánico de los tres ecotipos de *E. characias* en porcentaje por peso seco de parte aérea de planta variaron entre el 4.5 y el 11%, sin observarse prácticamente diferencias en rendimiento entre hojas y tallos, durante este periodo de recolección para plantas crecidas en una misma localización. El rendimiento más bajo se obtuvo para plantas crecidas en la comarca de l'Alt Maestrat (4.5-5.6%) mientras que el mayor rendimiento se obtuvo a partir de plantas crecidas en la Sierra de Espadán (7-11%). Los extractos metanólicos variaron entre el 19 y 14%, sin diferencias significativas entre las distintas localidades y partes aéreas de la planta. Un análisis del suelo, nos permitió observar un elevado porcentaje de arcilla en la zona de l'Alt Maestrat, por lo tanto una posible causa de los distintos perfiles metabólicos entre las zonas podría deberse a diferencias en la permeabilidad del terreno.

Identificación de metabolitos de ecotipos salvajes. Se identificaron los metabolitos mayoritarios, presentes en los extractos hexánicos de plantas provenientes de las tres zonas, mediante el análisis de cada cromatograma

obtenido por GC-MS. Esta identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) de los compuestos y sus patrones de fragmentación en los espectros de masas, con compuestos de referencia comerciales o metabolitos aislados previamente mediante purificación cromatográfica en el CEQA.

Los alcanos identificados fueron: nonacosano, hentriacontano y tritriacontano. Los ácidos grasos (palmítico, oleico y linoleico), fitol y los alcoholes de cadena larga (1-hexacosanol y 1-octacosanol) se identificaron por GC-MS a partir de muestras derivatizadas con trimetilsilano, observándose un pico mayoritario correspondiente al ión generado por la pérdida de un grupo metilo $[M-15]^+$. Los compuestos tipo triterpen-3-ol se identificaron en muestras derivatizadas y no derivatizadas. En las muestras derivatizadas se observó el pico molecular $[M]^+$, así como el pico correspondiente al ión generado por la pérdida de un grupo metilo, trimetilsilano y una molécula de agua $[M-15-SiCH_3-H_2O]^+$. Los triterpenos identificados de tipo triterpen-3-ol fueron: lanosterol, butyrospermol, cycloartenol, lupeol y 24-methylenecycloartenol. También se encontró lupen-3-ona, una triterpenona identificada previamente en otras especies de *Euphorbia* [132-136]. Los t_R (min) y los fragmentos característicos de cada metabolito vienen recogidos en la Tabla 6. Las estructuras de los metabolitos se muestran en la Figura 1.

Nº	t _R (min)	PM	Fragmentos característicos m/z (%) ^a
1-TMS	8.3	328	313 (50) [M-15] ⁺ , 269 (3), 145 (38), 132 (44), 129 (67), 117 (92), 75 (83), 73 (100), 55 (61).
2-TMS	9.5	368	353 (0.2) [M-15] ⁺ , 278 (0.3), 213 (0.8), 157 (2), 143 (100), 110 (3), 109 (6), 97 (11), 95 (16), 83 (11), 82 (15), 81 (21), 75 (49), 73 (51), 69 (19), 68 (21), 67 (18), 57 (24), 55 (27).
3-TMS	9.6	352	337 (11) [M-15] ⁺ , 262 (5), 129 (26), 117 (24), 95 (37), 81 (57), 75 (91), 73 (100), 67 (79), 55 (62).
4-TMS	9.7	354	339 (12) [M-15] ⁺ , 264 (2), 145 (16), 129 (38), 117 (54), 95 (23), 81 (25), 75 (100), 73 (93), 67 (39), 55 (66).
5	16.5	410	410 (0.1) [M] ⁺ , 367 (0.3), 341 (0.7), 299 (0.3), 273 (0.4), 231 (1.3), 217 (1), 203 (2.3), 189 (2), 175 (4), 161 (3), 149 (11), 136 (15), 137 (18), 123 (17), 121 (23), 107 (20), 95 (39), 93 (27), 81 (95), 69 (100), 67 (30), 55 (25).
6-TMS	17.3	454	454 (0.1) [M] ⁺ , 441 (19), 439 (62) [M-15] ⁺ , 423 (1), 139 (5), 125 (13), 111 (32), 103 (69), 97 (60), 85 (32), 83 (61), 75 (100), 73 (64), 57 (44), 55 (59).
7	17.3	408	408 (0.1) [M] ⁺ , 365 (0.2), 351 (0.1), 337 (0.2), 323 (0.2), 309 (0.2), 295 (0.3), 281 (0.3), 267 (0.4), 253 (0.6), 239 (0.8), 225 (1), 211 (1), 197 (2), 183 (2), 169 (3), 155 (4), 141 (6), 127 (9), 113 (14), 99 (25), 97 (15), 85 (70), 83 (18), 71 (84), 69 (26), 57 (100), 55 (41).
8-TMS	19.1	482	469 (12) [M-15+2H] ⁺ , 468 (31) [M-15+H] ⁺ , 451 (0.4), 367 (0.2), 353 (0.2), 339 (0.3), 325 (0.3), 309 (0.2), 297 (0.3), 283 (0.3), 269 (0.3), 255 (0.4), 213 (0.4), 139 (2), 125 (6), 111 (15), 103 (38), 97 (34), 91 (17), 85 (7), 83 (32), 75 (100), 71 (14), 69 (35), 87 (44), 55 (37).
9	19.9	436	436 (0.2) [M] ⁺ , 393 (0.2), 379 (0.4), 365 (0.4), 351 (0.5), 337 (0.5), 323 (0.7), 309 (0.8), 295 (1), 281 (1), 267 (2), 253 (2), 239 (2), 225 (3), 211 (4), 197 (6), 183 (7), 169 (10), 155 (14), 141 (22), 127 (28), 113 (43), 99 (66), 97 (52), 85 (100), 83 (52), 71 (48), 70 (67), 69 (63), 57 (50), 55 (82).
10	21.8	436	418 (0.4) [M-18] ⁺ , 391 (0.1), 292 (0.1), 278 (0.2), 264 (0.2), 250 (0.3), 236 (0.3), 222 (0.4), 208 (0.6), 194 (0.6), 180 (0.8), 166 (1), 152 (2), 141 (0.8), 137 (5), 127 (1), 123 (9), 111 (12), 109 (13), 97 (34), 96 (42), 95 (30), 85 (24), 83 (44), 82 (64), 81 (33), 71 (47), 68 (33), 57 (100), 55 (51).
11	22.5	464	464 (0.03) [M] ⁺ , 435 (0.03), 421 (0.04), 407 (0.06), 393 (0.07), 365 (0.08), 351 (0.1), 337 (0.1), 323 (0.1), 309 (0.2), 295 (0.2), 281 (0.2), 267 (0.3), 253 (0.4), 239 (0.5), 225 (0.7), 211 (1), 197 (1), 183 (2), 169 (2), 155 (3), 141 (4), 127 (6), 113 (10), 99 (18), 85 (47), 71 (69), 57 (100).
12	23.0	414	414 (2) [M] ⁺ , 396 (10) [M-18] ⁺ , 381 (7) [M-18-15] ⁺ , 329 (5), 303 (5), 275 (7), 255 (16), 231 (5), 213 (24), 201 (5), 199 (9), 191 (5), 185 (8), 177 (9), 173 (14), 163 (21), 161 (25), 159 (35), 147 (42), 145 (62), 143 (29), 135 (29), 133 (36), 131 (35), 121 (42), 119 (38), 117 (27), 109 (34), 107 (60), 105 (70), 95 (62), 93 (54), 91 (63), 85 (33), 81 (83), 79 (49), 71 (42), 69 (60), 67 (50), 57 (78), 55 (100).
13	23.3	426	426 (1) [M] ⁺ , 411 (6) [M-15] ⁺ , 393 (14) [M-15-18] ⁺ , 297 (2), 255 (4), 241 (6), 229 (4), 215 (5), 201 (5), 189 (10), 173 (8), 159 (11), 147 (11), 145 (12), 133 (13), 121 (18), 119 (21), 109 (31), 107 (20), 105 (22), 95 (32), 93 (20), 91 (20), 83 (13), 81 (27), 79 (17), 69 (100), 55 (61).
14	23.6	426	426 (0.2) [M] ⁺ , 411 (7) [M-15] ⁺ , 393 (0.5) [M-15-18] ⁺ , 259 (3), 255 (3), 241 (5), 229 (4), 215 (4), 201 (5), 187 (9), 173 (13), 161 (11), 159 (12), 149 (11), 147 (15), 145 (14), 135 (18), 133 (18), 131 (13), 123 (15), 121 (21), 119 (26), 109 (37), 107 (28), 105 (29), 95 (38), 93 (26), 91 (26), 83 (15), 81 (35), 79 (22), 69 (100), 67 (24), 55 (55).
15	23.9	424	425 (2) [M+1] ⁺ , 410 (2) [M-15] ⁺ , 381 (0.5) [M-15-18] ⁺ , 368 (1), 313 (7), 245 (11), 232 (6), 218 (10), 205 (48), 189 (28), 177 (11), 175 (20), 163 (20), 161 (23), 149 (29), 147 (30), 135 (38), 133 (31), 123 (45), 121 (67), 119 (41), 109 (86), 107 (78), 105 (44), 95 (98), 93 (84), 91 (52), 81 (100), 79 (65), 69 (77), 67 (84), 55 (59).
16	24.1	426	426 (0.6) [M] ⁺ , 411 (2) [M-15] ⁺ , 408 (2) [M-15-18] ⁺ , 393 (5), 365 (3), 339 (2), 286 (4), 271 (4), 215 (3), 203 (7), 201 (7), 189 (7), 187 (8), 147 (20), 145 (13), 135 (20), 133 (20), 123 (15), 121 (29), 119 (26), 109 (32), 107 (36), 105 (30), 95 (52), 93 (39), 91 (30), 81 (42), 79 (31), 69 (100), 67 (35), 55 (62).
17	24.2	426	426 (1) [M] ⁺ , 408 (3) [M-18] ⁺ , 393 (3) [M-18-15] ⁺ , 365 (8), 297 (6), 257 (5), 229 (12), 218 (8), 207 (17), 203 (21), 189 (47), 175 (27), 161 (36), 147 (41), 135 (59), 123 (43), 121 (73), 119 (57), 109 (63), 107 (81), 105 (60), 95 (88), 93 (100), 91 (61), 81 (84), 79 (67), 77 (30), 69 (65), 67 (77), 55 (85).
18	24.9	440	440 (0.4) [M] ⁺ , 425 (2) [M-15] ⁺ , 422 (2) [M-15-18] ⁺ , 407 (6), 379 (3), 216 (5), 203 (10), 201 (11), 189 (13), 187 (13), 175 (21), 173 (17), 163 (15), 161 (22), 159 (17), 149 (19), 147 (28), 145 (18), 133 (31), 123 (29), 121 (40), 109 (44), 107 (55), 105 (41), 95 (72), 93 (51), 91 (39), 83 (33), 81 (60), 79 (41), 69 (88), 67 (44), 55 (100).

Tabla 6. Tiempo de retención (t_R) por GC-FID relativo a tetracosano ($t_R = 11.8$ min) y en GC-MS relación m/z de los iones generados en muestras derivatizadas (ácidos grasos y alcoholes) y no derivatizadas (alcanos, alquenos, triterpenos, esteroides y aldehídos).

IV. Resultados y Discusión

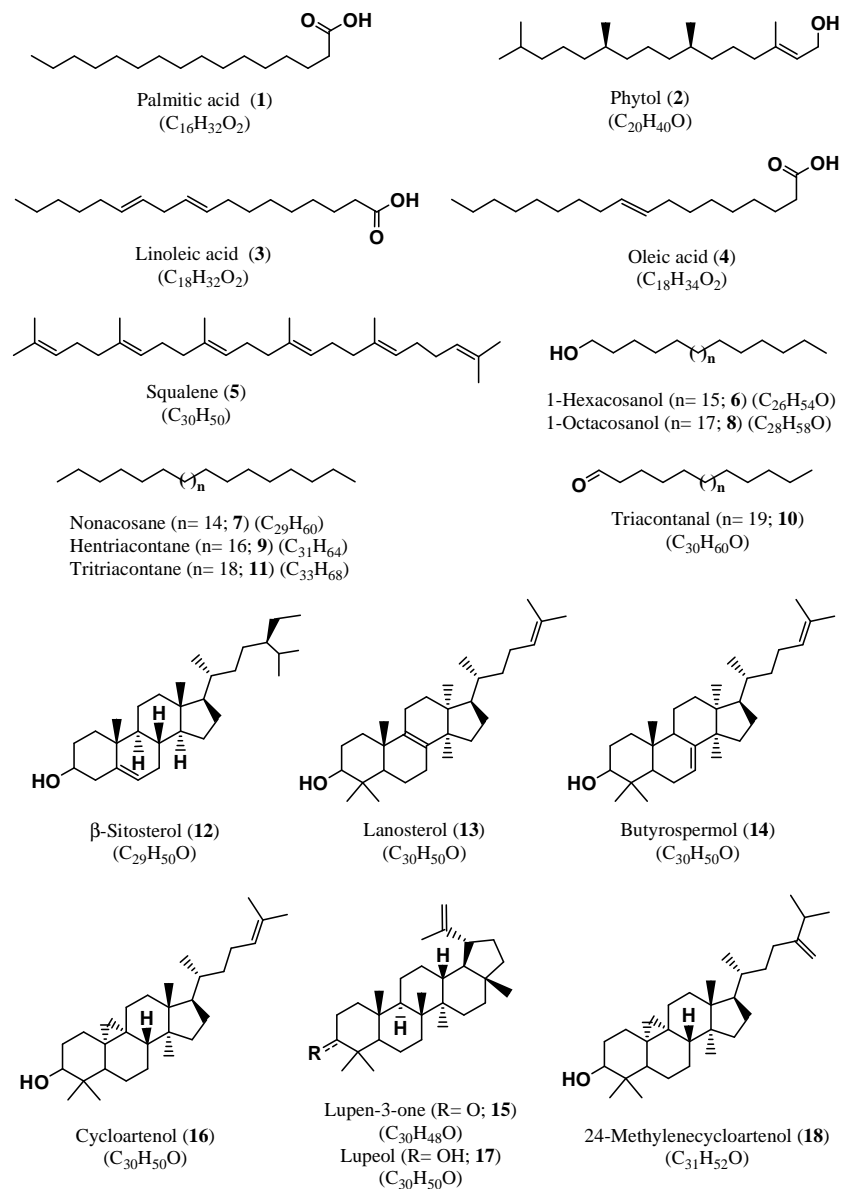


Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos hidrocarbonados identificados en *E. characias* y agrupados en ácidos grasos (**1,3,4**), alcanos (**7,9,11**), alcoholes (**6,8**) triterpenos (**13-18**) y esteroides (**12**).

IV. Resultados y Discusión

Cuantificación de metabolitos. El análisis realizado por GC-FID detectó la presencia de 18 picos mayoritarios presentes en las tres diferentes localizaciones. Estos picos representaban entre el 87%-96% de toda el área del cromatograma. Con la finalidad de calcular la concentración de metabolitos se construyeron curvas de calibrado para cada uno de los compuestos identificados, a partir de compuestos de referencia comerciales: ácido palmítico, fitol, ácido linoleico, ácido oleico, escualeno, hexacosanol, nonacosano, octacosanol, hentriacontano, tritriacontano, β -sitosterol, lanosterol, cycloartenol y lupeol; o bien a partir de metabolitos aislados previamente en CEQA: triacontanal, butyrospermol, lupen-3-ona y 24-methylenecycloartenol. En la Figura 2 se muestra una sección del cromatograma GC-FID, donde se señalan los metabolitos mayoritarios del extracto hexánico de *E. characias*.

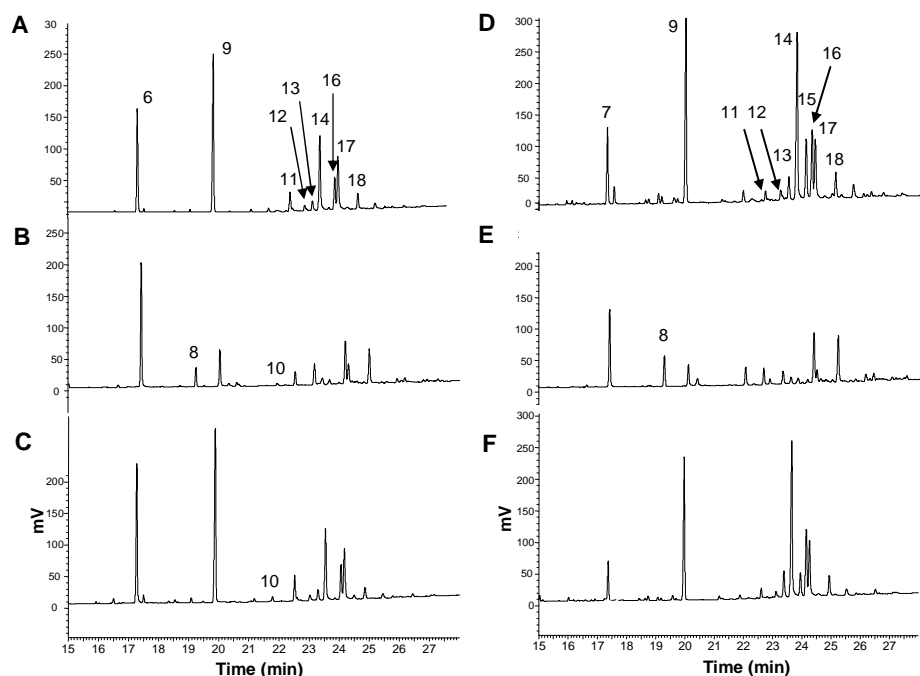


Figura 2. Sección del cromatograma GC-FID del extracto hexánico de *E. characias* recolectada en Julio de 2009: (A) hojas de la Sierra de Espadan, (B) hojas de L'Alt Maestrat, (C) hojas de Sierra de Mariola, (D) tallos de Sierra de Espadan, (E) tallos de L'Alt Maestrat, (F) tallos de Sierra de Mariola. Compuestos: **6**, hexacosanol; **7**, nonacosano, **8**, octacosanol; **9**, hentriacontano, **10**, triacontanal; **11**, tritriacontano; **12**, β -sitosterol; **13**, lanosterol; **14**, butyrospermol; **15**, lupen-3-ona; **16**, cycloartenol; **17**, lupeol; **18**, 24-methylenecycloartenol.

El contenido de los metabolitos mayoritarios de los extractos hexánicos se expresó en mg de metabolito por 1 g de peso seco de la parte aérea de la planta (Tablas 7-9).

IV. Resultados y Discusión

			Compuestos (mg/ 1 g de peso seco de parte aérea)				
			1	3	4	2	5
S.de Espadan	hojas	09	0.67±0.03	0.22±0.05	0.83±0.07	-	-
	tallos	Jul	0.57±0.00	0.09±0.00	0.43±0.05	-	-
	hojas	Sep	0.76±0.01	0.17±0.00	0.72±0.00	-	-
	tallos	Sep	0.56±0.00	0.12±0.00	0.58±0.00	-	-
L'Alt Maestrat	hojas	09	1.21±0.04	0.14±0.00	0.59±0.02	0.39±0.01	0.04±0.00
	tallos	Jul	1.35±0.07	0.17±0.01	0.69±0.04	-	0.03±0.01
	hojas	Sep	0.87±0.00	0.09±0.00	0.41±0.00	0.06±0.00	0.06±0.00
	tallos	Sep	0.52±0.00	0.09±0.00	0.38±0.00	-	-
S. de Mariola	hojas	09	0.64±0.00	-	-	-	0.13±0.00
	tallos	Jul	0.47±0.00	0.14±0.00	0.53±0.01	-	-
	hojas	Sep	0.63±0.00	0.18±0.00	-	-	0.30±0.00
	tallos	Sep	0.52±0.01	-	-	-	-

Media ± error estándar (3 repeticiones, n=3). Compuestos: **1**, ácido palmítico; **2**, fitol; **3**, ácido oleico; **4**, ácido linoleico; **5**, escualeno.

Tabla 7. Cuantificación de los metabolitos **1-5** en hojas y tallos de *E. characias* en las tres localizaciones estudiadas durante los meses de julio y septiembre de 2009. El rendimiento de los compuestos se ha calculado como cantidad de metabolito (mg) por g de peso seco de parte aérea de la planta.

IV. Resultados y Discusión

			Compuestos (mg/ 1 g de peso seco de parte aérea)					
			6	7	8	9	10	11
S. de Espadan	hojas	Jul 09	10.51 ±0.03	-	-	13.85 ±0.16	-	1.40 ±0.02
	tallos		-	1.49 ±0.00	-	5.60 ±0.01	0.92 ±0.01	0.22 ±0.00
	hojas	Sep 09	9.85 ±0.14	-	-	10.35 ±0.05	-	0.90 ±0.00
	tallos		-	1.20 ±0.01	-	6.13 ±0.00	0.61 ±0.00	0.26 ±0.00
L'Alt Maestrat	hojas	Jul 09	8.03 ±0.51	-	2.34 ±0.06	1.90 ±0.15	-	0.66 ±0.02
	tallos		-	3.10 ±0.26	5.93 ±0.57	1.20 ±0.11	3.74 ±0.41	0.83 ±0.04
	hojas	Sep 09	10.68 ±0.14	-	5.18 ±0.10	3.23 ±0.01	1.21 ±0.24	0.78 ±0.01
	tallos		-	1.87 ±0.02	3.14 ±0.03	0.61 ±0.37	2.98 ±0.12	2.55 ±0.01
S. de Mariola	hojas	Jul 09	11.11 ±0.02	-	0.68 ±0.01	13.29 ±0.04	0.88 ±0.02	1.59 ±0.09
	tallos		-	1.13 ±0.00	-	6.98 ±0.01	0.51 ±0.01	0.40 ±0.00
	hojas	Sep 09	11.58 ±0.07	-	0.84 ±0.02	6.65 ±0.02	0.80 ±0.03	0.35 ±0.19
	tallos		-	2.16 ±0.21	-	11.48 ±0.03	-	1.14 ±0.03

Media ± error estándar (3 repeticiones). Compuestos: **6**, hexacosanol; **7**, nonacosano, **8**, octacosanol; **9**, hentriacontano, **10**, triacontanal; **11**, tritriacontano.

Tabla 8. Cuantificación de los metabolitos **6-11** en hojas y tallos de ecotipos salvajes de *E. characias* de las tres localizaciones estudiadas durante julio y septiembre de 2009. El rendimiento de los compuestos se ha calculado como cantidad de metabolito (mg) por g de peso seco de parte aérea de la planta.

IV. Resultados y Discusión

		Compuestos (mg/ 1 g de peso seco de parte aérea)							
		12	13	14	15	16	17	18	
S. de Espadan	hojas	Jul 09	0.50	1.13	33.01	0.45	8.83	4.66	4.47
			±0.14	±0.01	±0.24	±0.12	±0.04	±0.06	±0.03
	tallos	Jul 09	0.20	0.84	25.76	5.74	6.37	1.67	2.34
			±0.06	±0.01	±0.13	±0.00	±0.01	±0.01	±0.02
hojas	Sep 09	0.70	1.42	39.73	0.41	10.73	5.08	4.94	
		±0.01	±0.01	±0.14	±0.14	±0.08	±0.06	±0.02	
tallos	Sep 09	0.41	2.18	44.10	3.57	9.27	2.69	3.42	
		±0.00	±0.01	±0.23	±0.00	±0.02	±0.02	±0.01	
L'Alt Maestrat	hojas	Jul 09	1.39	0.54	1.38	-	7.68	1.07	6.36
			±0.04	±0.02	±0.05	-	±0.22	±0.05	±0.20
	tallos	Jul 09	0.97	0.54	1.20	0.40	9.77	0.71	9.27
			±0.04	±0.03	±0.36	±0.15	±0.53	±0.04	±0.49
hojas	Sep 09	0.84	0.65	1.34	-	8.58	0.63	5.23	
		±0.01	±0.01	±0.52	-	±0.07	±0.01	±0.03	
tallos	Sep 09	0.64	1.45	3.86	0.33	15.67	0.25	8.21	
		±0.01	±0.01	±0.02	±0.20	±0.65	±0.12	±0.03	
S. de Mariola	hojas	Jul 09	0.47	1.06	26.05	-	8.14	3.79	2.14
			±0.13	±0.01	±0.15	-	±0.05	±0.03	±1.03
	tallos	Jul 09	0.36	1.65	40.21	2.59	10.83	2.62	3.34
			±0.00	±0.02	±0.40	±1.38	±0.13	±0.04	±0.02
hojas	Sep 09	0.51	1.08	31.96	0.85	8.48	4.28	2.18	
		±0.16	±0.02	±0.29	±0.03	±0.06	±0.05	±1.05	
tallos	Sep 09	0.69	0.49	21.04	7.02	6.05	1.85	1.80	
		±0.19	±0.37	±0.49	±0.15	±0.04	±0.03	±0.83	

Media ± error estándar (3 repeticiones). Compuestos: **12**, β-sitosterol; **13**, lanosterol; **14**, butyrospermol; **15**, lupen-3-one; **16**, cycloartenol; **17**, lupeol; **18**, 24-methylenecycloartenol.

Tabla 9. Cuantificación de los metabolitos **12-18** en hojas y tallos de ecotipos salvajes de *E. characias* de las tres localizaciones estudiadas durante julio y septiembre de 2009. El rendimiento de los compuestos se ha calculado como cantidad de metabolito (mg) por g de peso seco de parte aérea de la planta.

IV. Resultados y Discusión

En las tres localizaciones estudiadas, los compuestos mayoritarios encontrados en los extractos hexánicos fueron: alcoholes primarios de cadena larga, alcanos lineales y triterpenos. Respecto a los alcoholes primarios cabe destacar que Conti *et al.* [132] ya observaron la presencia de 1-hexacosanol como el alcohol mayoritario del extracto de hojas de *E. characias*. En nuestros tres ecotipos, se encontró una concentración elevada de 1-hexacosanol, principalmente en hojas (entre 8 y 11.6 mg g⁻¹) (Tabla 8). Podemos resumir que:

Los extractos hexánicos de plantas crecidas en *l'Alt Maestrat* se distinguieron por:

- La presencia de 1-octacosanol (entre 2.3-5.9 mg g⁻¹) tanto en hojas como en tallos.
- Elevadas concentraciones de nonacosano (1.9-3.1 mg g⁻¹ por peso seco de tallos).
- Se observaron bajas concentraciones de lupen-3-ona, especialmente distribuida en tallos (< 0.4 mg g⁻¹).
- Cycloartenol y 24-methylenecycloartenol fueron los triterpenos mayoritarios.
- Bajas concentraciones de lupeol (< 1.1 mg g⁻¹).

Las plantas crecidas en las *Sierras de Espadán* y *Mariola* se distinguieron por:

- El alcano mayoritario fue hentriacontano, alcanzando los 13.8 y 13.3 mg g⁻¹.
- Los mayores rendimientos en lanosterol se determinaron en estas dos zonas y especialmente en las plantas recolectadas de la Sierra de Espadán (entre 0.8-2.2 mg g⁻¹).

IV. Resultados y Discusión

- Butyrospermol (isómero del lanosterol) fue el triterpeno mayoritario.
- Lupen-3-ona, especialmente distribuida en tallos, mostró valores similares para las Sierras de Espadán y Mariola (entre 0.4-5.7 y entre 0.9-7.0 mg g⁻¹, respectivamente).
- Lupeol, mayoritario en hojas, se encontró en el mismo rango de concentraciones para ambas zonas (entre 1.7-5.1 mg g⁻¹ y 1.9-4.3 mg g⁻¹).

Muchos autores han descrito la utilidad del análisis del perfil de triterpenos como marcadores quimiotaxonómicos, en nuestro caso y en vista de los resultados obtenidos, se pudieron distinguir 2 posibles quimiotipos distintos ya que en función del biotipo (periodos de luz, clima, composición del suelo, altitud, etc) observamos que la misma planta es capaz de biosintetizar metabolitos diferentes [137,138]. Por un lado, las plantas crecidas en las Sierras de Espadán y Mariola; por otro, las plantas de l'Alt Maestrat. Probablemente, esta alteración en la composición de metabolitos puede ser debido a factores geoclimáticos.

Análisis de componentes principales (PCA). A partir de los datos de las Tablas 7-9, concentración de metabolitos en hojas y tallos de cada zona (expresados en mg por 1 g de peso seco de parte aérea de planta) determinados mediante GC-FID, se realizó un análisis multivariante de componentes principales (PCA). Esta técnica estadística nos permite reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, en nuestro caso la concentración de los 18 metabolitos en cada zona de recolección y para cada una de las partes aéreas de la planta. Mediante el PCA hemos identificado aquellas componentes principales que explican la mayor parte de la variabilidad que existe entre todo el conjunto de datos, resultando que las dos primeras explican el 94% de la variabilidad total existente entre las

muestras. Hemos observado tendencias de agrupación según la localización geográfica y la parte aérea de la planta (Figura 3). La primera componente principal (PC1) explica el 82% de toda la variabilidad, y permite separar las muestras de L'Alt Maestrat (Culla) de las otras dos zonas, es decir, se distinguen dos posibles quimiotipos (mencionados anteriormente) (Figura 3A). La representación del *loading plot* de la PC1 nos muestra los metabolitos más diferenciales (que más contribuyen a la varianza) entre los dos grupos, observándose que las diferencias son debidas principalmente a la mayor concentración de butyrospermol y, en menor medida, de hentriacontane en las muestras recogidas en las zonas de Espadán y Mariola. Asimismo, se observan concentraciones mayores de 1-octacosanol en las muestras recolectadas en L'Alt Maestrat (Figura 3B). La segunda componente (PC2), que explica poco más del 12% de la variabilidad, permite agrupar las muestras en función de la parte aérea de la planta analizada, y nos muestra que el perfil de metabolitos es significativamente diferente entre hojas y tallos (Figuras 3C). La representación del *loading plot* de la PC2 nos revela que la principal diferencia entre sus perfiles metabólicos son los niveles más elevados en hojas de 1-hexacosanol y hentriacontane, y en menor medida de lupeol, mientras que en tallos se encuentran concentraciones algo mayores de butyrospermol y lupenona (Figura 3D). Así, mediante este análisis de PCA hemos creado un modelo que nos permite clasificar las muestras en función de la parte aérea de la planta y de la zona de recolección.

IV. Resultados y Discusión

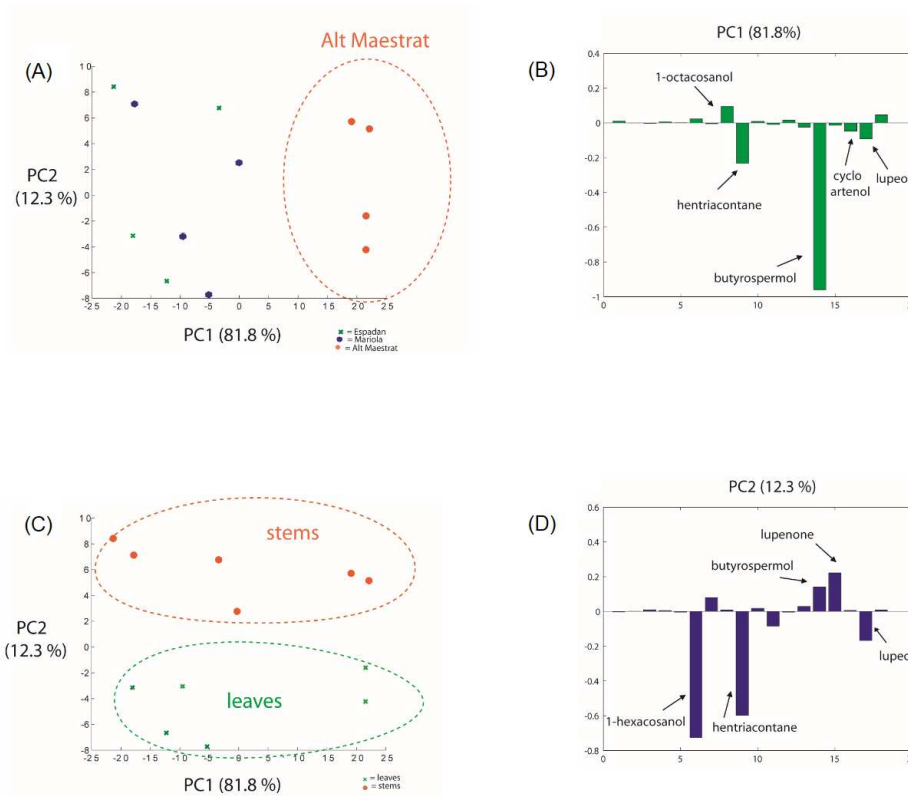


Figura 3. Análisis de Componentes Principales (PCA) *score plots* y *loading plots* de las concentraciones de metabolitos (mg g^{-1} peso seco de parte aérea) de los extractos hexánicos de las tres zonas geográficas estudiadas: (A) y (C) *Score plot* PC2 vs PC1, (B) *Loading plot* PC1, (D) *Loading plot* PC2.

En conclusión, este estudio sobre *E. characias* de plantas salvajes recogidas en tres localizaciones distintas de la Comunidad Valenciana (Sierra de Espadán, l'Alt Maestrat y Sierra de Mariola), nos permitió determinar el ecotipo de las plantas salvajes estudiadas que presentó un mayor rendimiento en extracto hexánico, así como un perfil metabólico adecuado como potencial fuente de biocombustible. En vista de los resultados

obtenidos, se eligieron las plantas crecidas en la Sierra de Espadán ya que mostraron el mayor rendimiento en extracto hexánico (compuesto fundamentalmente por triterpenos e hidrocarburos), y un mayor peso por planta seca (mayor biomasa). Así pues, durante la primavera de 2010 se procedió a la recolección de semillas para posteriormente llevar a cabo el cultivo de *E. characias*. Cabe decir, que las plantas crecidas en la Sierra de Mariola también presentaron un alto rendimiento en extracto hexánico así como un peso seco muy similar a las de la Sierra de Espadán.

3. Estudio agronómico de *E. characias*. Plantas cultivadas

Las semillas recolectadas en la Sierra de Espadán se plantaron en semilleros y posteriormente se trasplantaron y cultivaron en instalaciones del IVIA (Moncada), con el objetivo de llevar a cabo un estudio agronómico exhaustivo que determine los parámetros de cultivo óptimos de esta planta como potencial fuente de bioenergía.

3.1. Ensayo 1: Estudio de la respuesta a diferentes dosis de riego

La finalidad de este experimento fue determinar la relación entre el consumo de agua y el crecimiento en biomasa, así como la producción de compuestos hidrocarbonados y carbohidratos, en los extractos hexánico y metanólico respectivamente.

Para comprobar el estado fisiológico de la planta, desde finales de primavera de 2011 hasta otoño de 2012 se hizo un seguimiento de los parámetros más importantes que reflejan el nivel de estrés hídrico de la planta. Se evaluó en qué grado afecta la dosis de riego al crecimiento y producción de compuestos hidrocarbonados. Así mismo, se midió el

potencial hídrico de las hojas con la finalidad de monitorizar el estado hídrico de la planta.

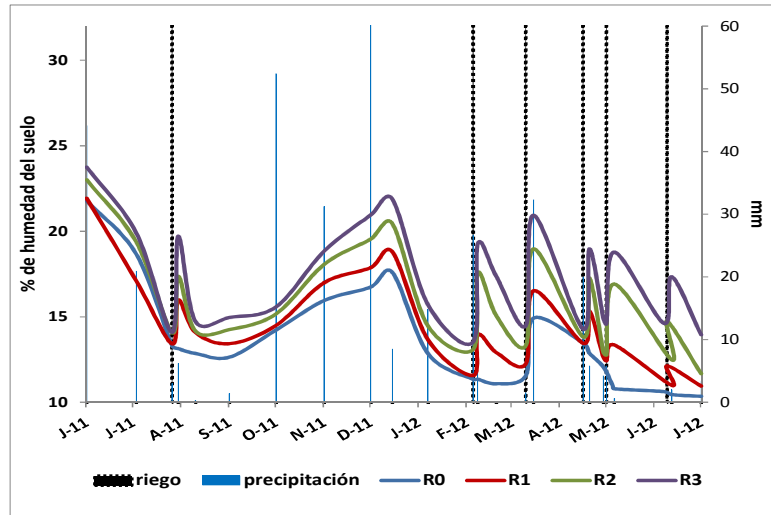


Figura 4. Evolución del contenido en humedad del suelo a lo largo del periodo de estudio. La figura muestra la respuesta del suelo ante cada uno de los aportes de agua recibidos ya sean por riego o por precipitación desde julio del 2011 hasta julio de 2012.

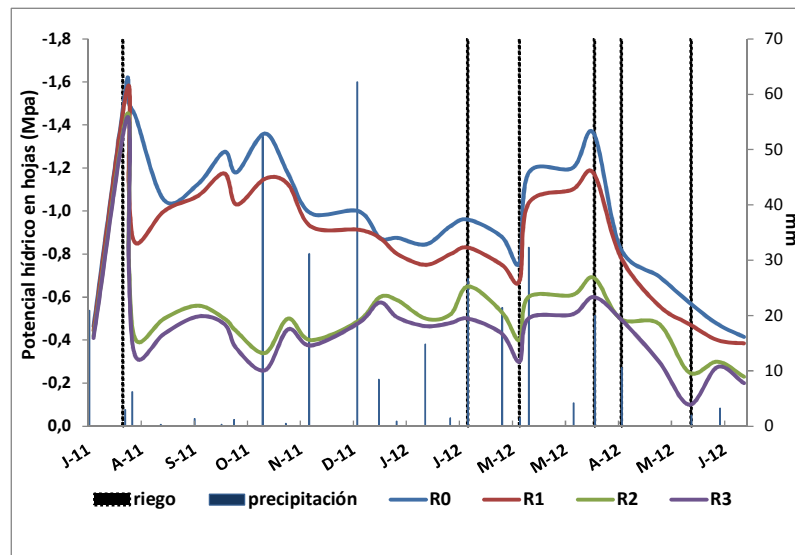


Figura 5. Evolución del potencial hídrico en hojas durante el periodo de estudio desde julio de 2011 hasta junio de 2012, para los distintos regímenes de riego. El valor para cada uno de los puntos es la media de un mínimo de tres repeticiones.

En las Figuras 4 y 5 se puede observar que los distintos regímenes de riego fueron capaces de inducir marcadas diferencias en el contenido de humedad del suelo y en el potencial hídrico de las hojas. En el periodo comprendido entre junio de 2011 y junio de 2012 las parcelas de experimentación se regaron cada vez que la parcela R3 descendía en un 40% la capacidad de campo (apartado 5.1. de Material y Métodos) y como se observa en la Figura 4, durante el periodo primaveral existe una mayor demanda de agua de riego, aplicándose en este periodo cinco de los seis riegos totales. El hecho de que esta planta presente una demanda de agua inferior en los meses estivales, cuando la evapotranspiración es más alta, podría indicar que la planta ha desarrollado un sistema capaz de evitar la deshidratación, tal y como ha sido previamente descrito para *E. lathyris* [80].

Una representación gráfica de las curvas de crecimiento de las plantas (Figura 6) muestra que *E. characias* presenta tres fases de crecimiento bien diferenciadas. La fase I comprende el periodo inicial de crecimiento vegetativo relativamente lento, que va desde el trasplante (abril) hasta el principio del invierno (diciembre); la fase II corresponde a un periodo de gran aumento de peso, coincidente con el desarrollo de los tallos florales y posteriormente de las flores, que ocurre entre diciembre y abril, siendo en este período donde existe una mayor demanda de agua por parte de la planta, tal y como hemos visto anteriormente en la Figura 4; en la fase III, posterior a la floración, se produce una pérdida de peso al desecarse los tallos florales y las hojas, con desprendimiento de gran parte de éstas. Estos resultados van en la línea de los obtenidos por Coppola y Brunori [139] que afirmaron que tras la floración el peso seco por planta disminuía. Es

interesante insistir en que el periodo de máximo crecimiento de las plantas, es decir, donde la pendiente de la curva de crecimiento fue mayor coincidió con el periodo invernal que parece indicar que *E. characias* es una planta que no sufre latencia invernal.

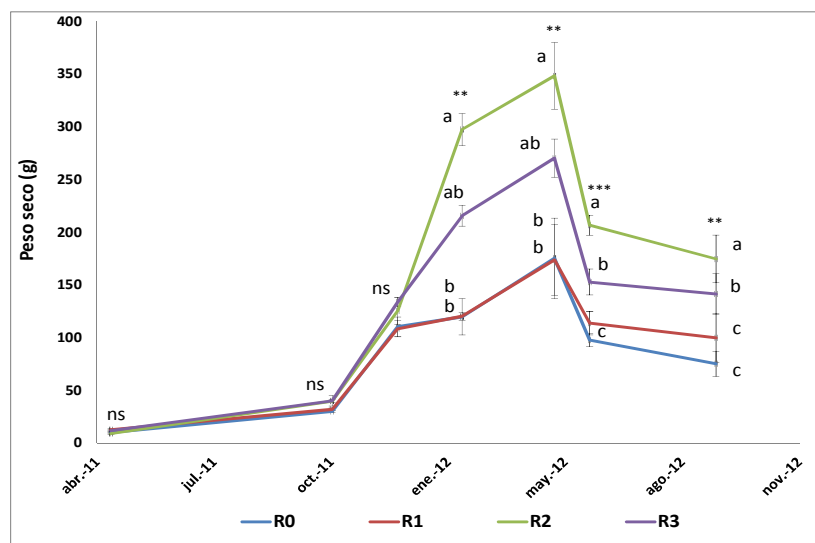


Figura 6. Evolución del peso seco de la planta a lo largo del experimento para los distintos regímenes de riego aplicados. Cada valor es la media aritmética de tres observaciones independientes (n=3). Significaciones estadísticas: *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001.

Además, teniendo en cuenta las dosis de riego aportadas en el periodo comprendido entre abril del 2011 y septiembre de 2012 (Figura 6), podemos afirmar que el máximo crecimiento se obtuvo con la dosis de 15 mm/riego (R2), mientras que la dosis máxima (30 mm/riego o R3) produce un crecimiento significativamente menor, posiblemente debido a la elevada sensibilidad de esta planta (adaptada a condiciones marcadamente áridas) al exceso de agua. Las diferencias significativas en cuanto a crecimiento se empezaron a manifestar a partir de febrero de 2012, coincidentes con la fase II descrita anteriormente. Así mismo, cabría destacar la pendiente de la

IV. Resultados y Discusión

curva de crecimiento cuando se aplica el riego R3 durante el periodo de diciembre a febrero, indicando una alta velocidad de crecimiento en esa etapa. El crecimiento de las plantas control (R0) y regadas con 7.5 mm/riego (R1) fue significativamente inferior, no detectándose diferencias significativas entre ambos tratamientos en ningún momento del periodo de estudio. Tan sólo se observó en verano de 2012 una pequeña diferencia (no significativa) de peso seco entre las plantas sometidas al tratamiento R1 y las que no fueron regadas (R0).

Por otra parte, los rendimientos en extracto hexánico y metanólico, así como los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina, se resumen en la Tabla 10. En general, no se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos R1, R2 y R3 relativas a la concentración de los extractos (hexánico y metanólico) así como la composición de la biomasa (celulosa, hemicelulosa y lignina) de la parte aérea de la planta analizados. Sin embargo, en este aspecto, sí aparecen diferencias entre los distintos estados fenológicos de la planta. Se observó un ligero descenso en la concentración del extracto hexánico durante la fase II (Tabla 10), debido probablemente al rápido crecimiento de la planta durante este periodo. Además, esta fase II coincide con el periodo en el cual la planta solicita una mayor demanda de agua, ratificando que el látex posee una función de defensa ante la deshidratación [103].

La composición del extracto hexánico se detalla en la Tabla 11, y tal y como sucede con el rendimiento de extracto hexánico en planta, la proporción de algunas de las fracciones que componen el extracto también varió según su estado fenológico. En la Figura 7A se observa una sección del cromatograma de GC-FID del extracto hexánico de hojas. Así, el

IV. Resultados y Discusión

contenido en alcanos aumenta en la fase III, debido al incremento de la concentración de hentriacontano (C₃₁) y en menor medida tritriacontano (C₃₃). Por el contrario, el contenido en ácidos grasos disminuye durante este mismo periodo, influyendo en esta tendencia el descenso en la concentración de los ácidos palmítico, linoleico y linolénico. Los alcoholes, los triterpenos y los esteroides permanecieron estables a lo largo de todo el ciclo.

	Extractos (%)		Biomasa (%)			
	Ext. Hexánico	Extr. MeOH	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	
<u>Fase I</u>	R0	8.17 ^a	21.57 ^a	15.28 ^b	10.77 ^b	8.23 ^a
	R1	7.38 ^a	21.41 ^a	14.68 ^b	11.02 ^b	7.95 ^a
	R2	7.72 ^a	19.91 ^a	15.11 ^b	10.21 ^b	7.79 ^a
	R3	7.85 ^a	16.39 ^b	15.24 ^b	10.94 ^b	6.95 ^a
<u>Fase II</u>	R0	6.56 ^b	15.82 ^b	22.53 ^a	15.68 ^a	5.44 ^b
	R1	6.30 ^b	19.09 ^a	22.96 ^a	15.83 ^a	5.17 ^b
	R2	5.82 ^b	19.28 ^a	23.98 ^a	14.27 ^a	4.24 ^b
	R3	5.59 ^b	18.69 ^{ab}	24.06 ^a	16.01 ^a	4.82 ^b
<u>Fase III</u>	R0	8.14 ^a	10.70 ^c	24.86 ^a	11.22 ^{ab}	6.97 ^a
	R1	8.02 ^a	15.96 ^b	24.33 ^a	12.88 ^{ab}	7.39 ^a
	R2	7.61 ^a	18.88 ^{ab}	23.10 ^a	13.40 ^{ab}	7.89 ^a
	R3	7.40 ^a	10.36 ^c	20.74 ^a	12.15 ^{ab}	5.94 ^a
<i>época</i>	***	**	***	***	***	
<i>tratamiento</i>	ns	**	ns	ns	ns	
<i>interacciones</i>	ns	**	ns	ns	ns	

Tabla 10. Rendimiento en componentes de alto valor energético según el estado fenológico (fase), siendo la fase I, la prefloración (cuando la planta todavía no ha desarrollado sus órganos florales), la fase II es la época que va desde la floración a la maduración del fruto y la expulsión de la semilla y la fase III el periodo posterior a la expulsión de la semillas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Significaciones estadísticas: *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001.

IV. Resultados y Discusión

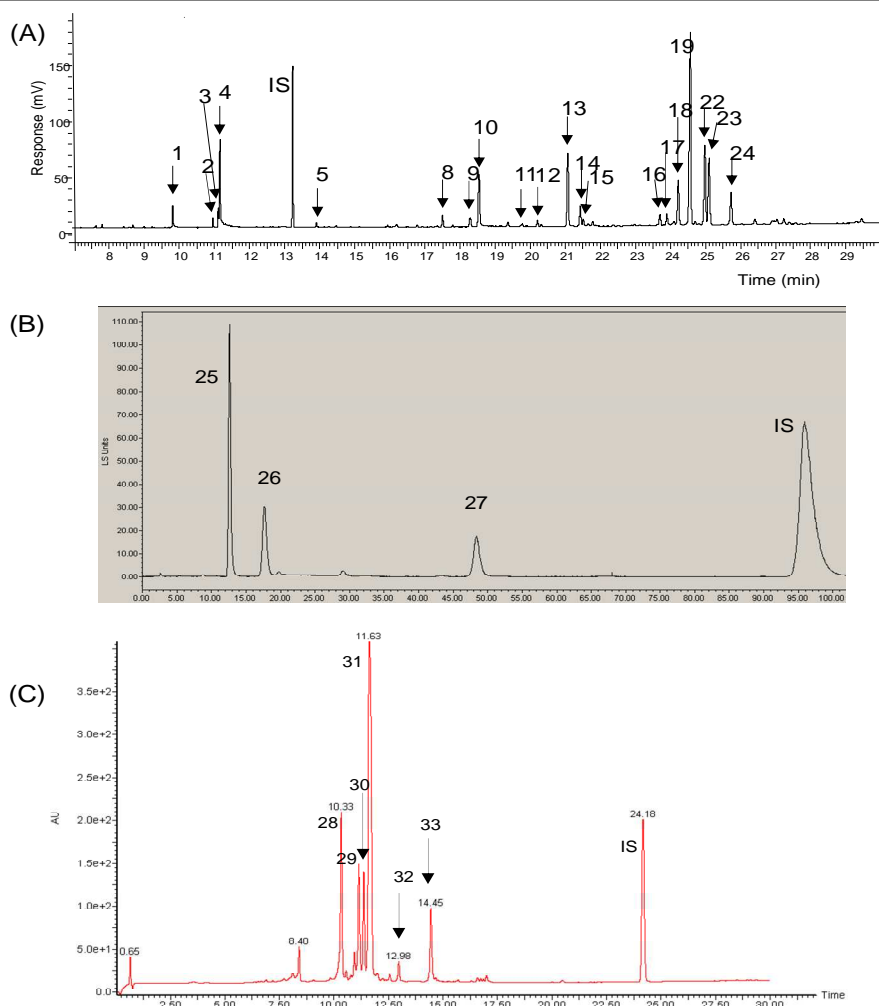


Figura 7. Cromatogramas de *E. characias* de plantas recolectadas en fase II (Mayo 2012) con el riego R2 (15 mm): (A) GC-FID de extracto hexánico de hojas (compuestos hidrocarbonados). Compuestos: **1**, ácido palmítico; **2**, fitol; **3**, ácido linoleico; **4**, ácido linolénico; **5**, pentacoseno; **8**, escualeno; **9**, nonacosano; **10**, hexacosanol; **11**, triacontano; **12**, octacosanal; **13**, hentriacontano; **14**, α -tocoferol; **15**, octacosanol; **16**, tritriacontano; **17**, β -sitosterol; **18**, lanosterol; **19**, butyrospermol; **22**, cycloartenol; **23**, lupeol; **24**, 24-methylenecycloartenol; **IS**, tetracosane; (B) HPLC-ELSD de extracto metanólico SPE1 (carbohidratos). Compuestos: **25**, D-fructosa; **26**, D-glucosa; **27**, sacarosa; **IS**, trehalose; (C) UPLC-PDA de extracto metanólico SPE2 (flavonoides). Compuestos: **28**, quercetin-3- β -glucósido; **29**, quercetin-3-xylosido; **30**, quercetin-3-arabinosido; **31**, quercitrin; **32**, quercetin-3-(2''-O-acetyl)arabinofuranosido; **33**, quercetin; **IS**, flavanona.

IV. Resultados y Discusión

	COMPUESTO	Fase I	Fase II	Fase III	
ALCANOS	HENTRIACONTANO	6.03 ^b	5.03 ^b	10.73 ^a	<i>P</i> <0.001
	NONACOSANO	1.0	0.78	1.16	<i>ns</i>
	TRIACONTANO	0.14	0.13	0.20	<i>ns</i>
	TRITRIACONTANO	0.52 ^c	0.33 ^b	0.95 ^a	<i>P</i> <0.001
	HEPTACOSANO	0.03 ^b	0.25 ^a	0.19 ^a	<i>P</i> <0.01
	<i>Total alcanos</i>	7.72 ^b	6.52 ^b	13.23 ^a	<i>P</i> <0.001
TRITERPENOS Y ESTEROLES	LANOSTEROL	1.97 ^{ab}	1.63 ^b	2.40 ^a	<i>P</i> <0.05
	SITOSTEROL	0.82 ^b	1.03 ^a	0.98 ^a	<i>P</i> <0.001
	LUPEOL	5.78	4.92	5.32	<i>ns</i>
	LUPENONA	0.45	0.67	0.67	<i>ns</i>
	β-AMYRINA	0.45 ^a	0.57 ^a	0.16 ^b	<i>P</i> <0.001
	BUTYROSPERMOL	11.14	11.43	14.30	<i>ns</i>
	24-MCA	3.01 ^a	2.38 ^b	2.85 ^a	<i>P</i> <0.05
	CA	7.37	6.73	7.96	<i>ns</i>
	<i>Total triterpenos y esteroles</i>	30.99	29.36	34.64	<i>ns</i>
ALCOHOLES	HEXACOSANOL	5.72	6.48	5.99	<i>ns</i>
	OCTACOSANOL	2.12 ^a	1.92 ^b	1.84 ^b	<i>P</i> <0.001
	<i>Total alcoholes</i>	7.84	8.40	7.83	<i>ns</i>
ÁCIDOS GRASOS	ÁCIDO PALMÍTICO	1.42 ^b	2.26 ^a	0.01 ^c	<i>P</i> <0.001
	ÁCIDO LINOLEICO	4.36 ^a	3.50 ^a	2.28 ^b	<i>P</i> <0.01
	ÁCIDO LINOLÉNICO	6.88 ^a	6.01 ^b	3.12 ^c	<i>P</i> <0.001
	<i>Total ác. grasos</i>	12.66 ^a	11.77 ^a	5.41 ^b	<i>P</i> <0.001

Tabla 11. Evolución del porcentaje de metabolitos identificados presentes en el extracto hexánico para el riego óptimo R2. Se ha cuantificado mediante GC-FID el 85% de metabolitos presentes en el cromatograma. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas (n=3) independientes sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases.

Volviendo a los resultados recogidos en la Tabla 10, la concentración del extracto metanólico experimentó ciertas variaciones con el riego y con el estado fenológico de la planta. Así, la proporción de dicho extracto mostró una disminución a partir de la fase II en las plantas no regadas, mientras que en las plantas hidratadas normalmente se mantuvo constante. Puesto que

gran parte del extracto metanólico está constituido por carbohidratos, la reducción porcentual del mismo en las plantas no regadas podría deberse a una disminución de la asimilación neta de CO₂, por el cierre de estomas característico de las plantas sometidas a estrés hídrico.

La determinación de las fracciones lignocelulósicas de la parte aérea de la planta mostró que tanto el contenido en celulosa como en hemicelulosa aumentan durante la fase II, mientras que el de lignina disminuye en este periodo (Tabla 10). El contenido en proteínas de la fracción lignocelulósica, mediante el análisis de N, mostró un porcentaje relativamente bajo de proteínas (7.28%).

La composición de extracto metanólico se detalla en la Tabla 12 y cabe decir, que no se vio afectada por los distintos riegos. La concentración de sacarosa fue el doble que glucosa y fructosa durante la fase I (prefloración) y esta disminuyó progresivamente hasta reducirse a la mitad en la fase III (postfloración), a expensas de incrementar la concentración de fructosa y glucosa. Este hecho podría ser debido a un aumento en la actividad de las enzimas invertasas para proporcionar la energía necesaria a las células [140]. Se observó que el porcentaje de flavonoides heterósidos, mayoritariamente quercitrin, fue significativamente mayor en la fase II. Estos compuestos están implicados en numerosas funciones fisiológicas de la planta incluyendo la regulación de hormonas del crecimiento, que podría explicar el aumento en la concentración de flavonoides durante esta fase II de rápido crecimiento. En la Figura 7B y 7C se observa una sección del cromatograma de extracto metanólico de hojas en HPLC-ELSD (carbohidratos) y UPLC-PDA (flavonoides), respectivamente.

IV. Resultados y Discusión

<u>COMPUESTO</u>		<u>Fase I</u>	<u>Fase II</u>	<u>Fase III</u>	
AZÚCARES	<i>D-FRUCTOSA</i>	16.77 ^b	21.47 ^a	18.90 ^b	<i>P</i> < 0.01
	<i>D-GLUCOSA</i>	16.68 ^b	22.14 ^a	26.21 ^a	<i>P</i> < 0.01
	<i>SACAROSA</i>	26.91 ^a	15.20 ^b	11.79 ^c	<i>P</i> < 0.001
	<i>Total azúcares</i>	60.36	58.81	56.90	<i>ns</i>
FLAVONOIDES HETERÓSIDOS	<i>QUERCETIN-3-β-GLUCÓSIDO</i>	0.50 ^c	1.25 ^a	0.80 ^b	<i>P</i> < 0.001
	<i>QUERCETIN-3-XILÓSIDO</i>	0.36 ^b	0.80 ^a	0.48 ^b	<i>P</i> < 0.001
	<i>QUERCETIN-3-ARABINÓSIDO</i>	0.70	0.79	0.50	<i>ns</i>
	<i>QUERCITRIN</i>	8.41 ^b	10.68 ^a	8.11 ^b	<i>P</i> < 0.01
	<i>QUERCETIN-3-(2"-O-(ACETIL-ARABINOFURANÓSIDO)</i>	0.07	0.13	0.11	<i>ns</i>
	<i>QUERCETINA</i>	0.49	0.77	0.50	<i>ns</i>
<i>Total flavonoides heterósidos</i>	10.53 ^b	14.42 ^a	10.50 ^b	<i>P</i> < 0.001	

Tabla 12. Evolución del porcentaje de metabolitos identificados presentes en el extracto metanólico para el riego óptimo R2. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas (n=3) independientes sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Los mono- y disacáridos se cuantificaron mediante HPLC-ELS y los flavonoides heterósidos mediante UPLC-PDA.

Si consideramos el crecimiento (en peso seco, PS) de la parte aérea de las plantas y la concentración de los extractos hexánico y metanólico (en % sobre PS) en los diferentes estados de desarrollo se obtiene, mediante el producto de ambos parámetros, la cantidad total de compuestos hidrocarbonados solubles en hexano (mayoritarios en látex) y en metanol (tipo carbohidratos) que contienen las plantas en su parte aérea. Los resultados, expuestos en las Figuras 8 y 9, indican que, en ambos casos, la mayor cantidad absoluta de dichos compuestos se encuentra en el momento de la floración (fase II) en las plantas que recibieron un total de 445 mm de agua (15 mm x 5 riegos + 370 mm de lluvia).

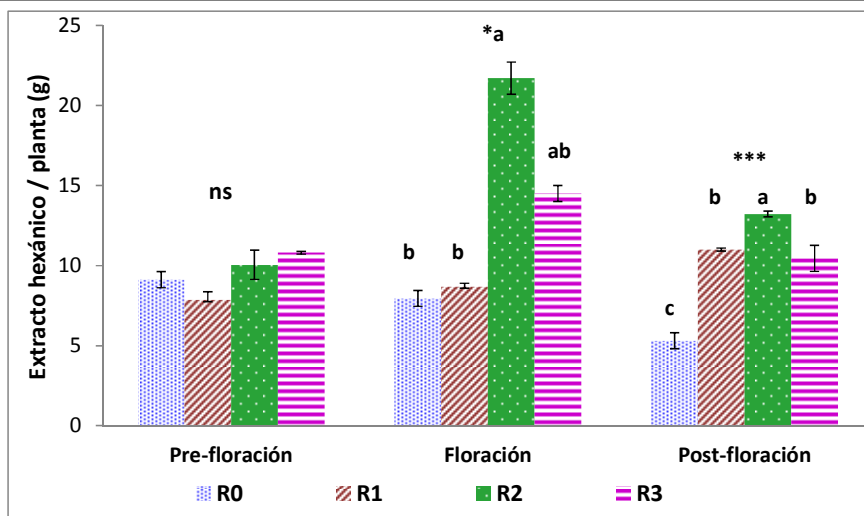


Figura 8. Extracto hexánico por planta en los diferentes estados fenológicos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Letras diferentes en cada fase indican diferencias significativas. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001.

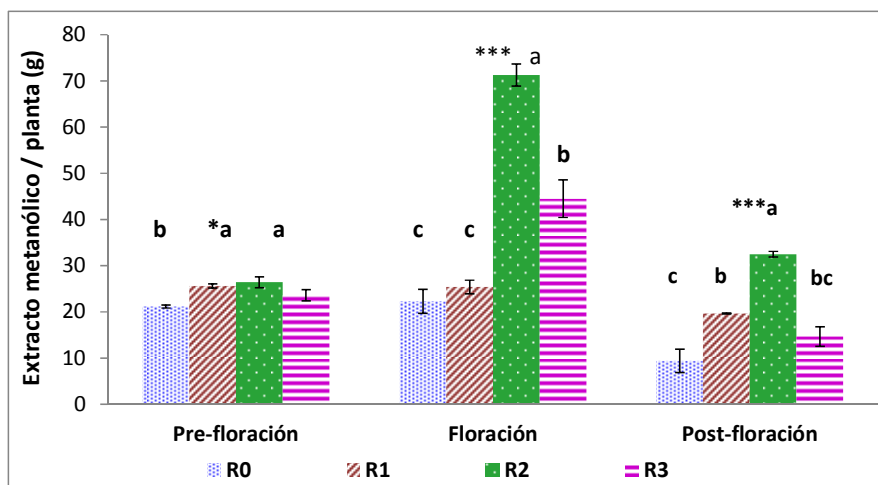


Figura 9. Extracto metanólico por planta en los diferentes estados fenológicos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento y fueron tomados al final de cada una de las fases. Letras diferentes en cada fase indican diferencias significativas. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001.

Así, el estudio de la respuesta de *E. characias* a diferentes dosis de riego nos ha permitido demostrar que el final del periodo de floración (fase II) coincide con un aumento significativo de la concentración de extracto hexánico (es decir, de látex) (Figura 8) y metanólico (Figura 9) mientras que en el inicio de la fase III (a partir del mes de mayo) empieza un descenso drástico del peso seco de la planta. Por lo tanto hemos determinado que:

1. El momento óptimo de recolección de la planta para obtener un máximo rendimiento energético (mayoritariamente compuestos hidrocarbonados y carbohidratos) por hectárea, corresponde al inicio de la maduración.
2. En nuestras condiciones climáticas la dosis de agua necesaria para cultivar *E. characias* durante un ciclo (desde abril de 2011 hasta principios de mayo de 2012) se corresponde a 445 mm, repartidos en riegos de 15 mm de agua (R2).
3. Usando las fórmulas desarrolladas empíricamente por Demirbas [141,142] y teniendo en cuenta los porcentajes de C,H,O y N calculados en el análisis elemental, el poder calorífico superior del marco lignocelulósico ($HHV = 0.0889L + 16.8218$), del extracto metanólico y del extracto hexánico ($HHV = 0.335C + 1.423H - 0.154O - 0.145N$) serían respectivamente: 17, 18 y 42 MJ Kg⁻¹. Por lo tanto el contenido energético de la biomasa celulósica de *E. characias*, viene a ser similar al de otras plantas lignocelulósicas como por ejemplo *Miscanthus* y *Switchgrass* [143], mientras que el contenido energético

del extracto metanólico es ligeramente superior al de la madera (15 MJ Kg⁻¹) y el extracto hexánico es similar al diésel (45 MJ Kg⁻¹).

3.2. Ensayo 2: Estudio de la respuesta ante los diferentes estreses abióticos

El objetivo de esta experiencia es determinar la tolerancia de *E. characias* a tres condiciones adversas del medio como son: la sequía, la alcalinidad del suelo y finalmente, la salinidad.

Para los distintos ensayos, plantas obtenidas en un semillero en el mes de abril se sembraron en varios contenedores con el suelo en sazón y, posteriormente, se les aplicaron los distintos tratamientos hasta finales de octubre. En este momento se arrancaron las plantas y después de desecadas se pesaron independientemente sus hojas, tallos y raíces. Tras realizar las correspondientes extracciones en Soxhlet, se determinó el contenido en extracto hexánico y metanólico de hojas y tallos. En cada experimento se midieron los parámetros de intercambio gaseoso (conductancia estomática y transpiración) y fotosintéticos (contenido en clorofila, fluorescencia y asimilación neta de CO₂), así como las relaciones hídricas y el contenido en algunos elementos minerales (N, Fe, Cl⁻ y Na⁺).

3.2.1. Estudio de la respuesta ante la sequía

El objetivo de este ensayo fue estudiar las respuestas fisiológicas de esta especie ante un estrés hídrico intenso y determinar su capacidad de resistencia a la falta de agua. Para ello, en el periodo de máxima demanda evaporativa, se separaron dos grupos de contenedores, uno de los cuales se mantuvo sin aporte de agua, cubriéndolos con un plástico para evitar la lluvia; el otro se regó cuando el nivel de humedad del suelo medido con una sonda capacitométrica descendía aproximadamente en un 40% de la capacidad

de campo a 30 cm de profundidad. Esto supuso la aplicación de dos riegos posteriores durante el periodo experimental que se aplicaron a finales de julio y de septiembre.

En la Figura 10 podemos observar que la falta de agua produjo una disminución progresiva del contenido de humedad del suelo, muy por debajo de la obtenida para el suelo que había sido regado dos veces. Durante el periodo de julio a octubre el suelo de las plantas sometidas al tratamiento de riego alcanzó el mínimo (aproximadamente 15% de humedad) a finales de septiembre, y por tanto hubo que regar. La humedad del suelo de las plantas no regadas descendió a partir de finales de junio de forma paralela a la del suelo de las plantas regadas, lo que parece sugerir que el estado hídrico de las plantas no influye en el nivel de absorción de agua.

Además, recíprocamente se deduce de la Figura 11 que el potencial hídrico de las hojas disminuyó también paulatinamente en las plantas no regadas, manteniéndose a niveles inferiores respecto a las plantas regadas. Se observó que después del riego se produce una respuesta de la planta en forma de un ascenso del potencial hídrico de las hojas. También es interesante destacar que, si bien para una misma medida los valores presentan diferencias significativas entre las plantas regadas y las no regadas, en estas últimas el potencial hídrico no alcanzó valores especialmente altos.

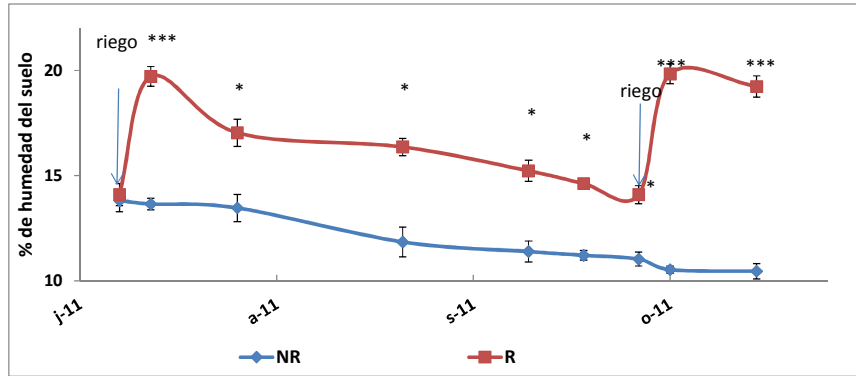


Figura 10. Contenido en humedad del suelo (%) correspondiente a las plantas no regadas (NR) y a las plantas regadas (R) durante el periodo de estudio. Cada valor es la media de tres observaciones (n=3) y se presenta con sus correspondiente errores. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

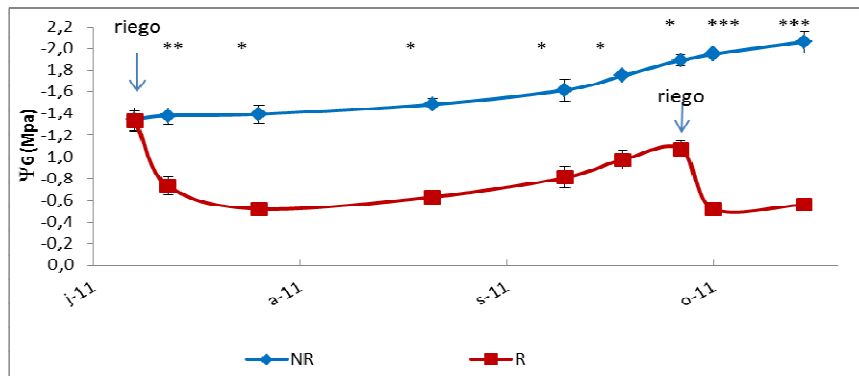


Figura 11. Evolución del potencial hídrico de las hojas (ψ_G) en plantas no regadas (NR) y plantas regadas (R) durante el periodo de estudio. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Este déficit hídrico en las plantas no regadas provocó el cierre de los estomas, al igual que sucedió en las plantas regadas justo antes del segundo riego. La Figura 12 muestra una relación estadísticamente significativa entre la conductancia estomática y porcentaje de humedad del suelo a juzgar por el valor de P ($P<0.001$) y el del coeficiente de correlación (0.907), como

IV. Resultados y Discusión

refleja el valor positivo del coeficiente de regresión en la ecuación de la recta ($y = 7.622x - 71.483$). Se podría decir que incluso con una disminución del contenido de humedad en el suelo relativamente baja, se produce una respuesta muy acusada en los estomas. Este hecho revela que esta planta, ante los déficits hídricos, presenta una conducta adecuada para evitar la deshidratación, tal y como afirmó Tenorio-Pasamón para *E. lathyris* [80]. Además, el cierre de los estomas condujo a una drástica reducción de la transpiración durante los meses de verano, aunque ésta fue menor en el caso de las plantas regadas debido a su mejor estado desde el punto de vista fisiológico.

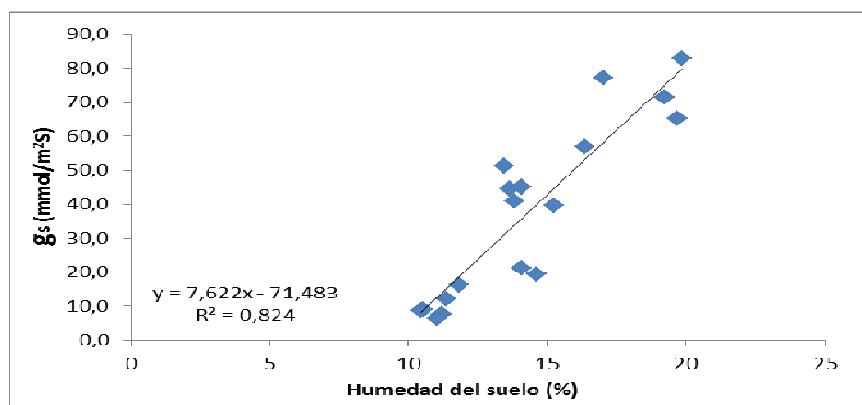


Figura 12. Relación entre el contenido en humedad del suelo y la conductancia estomática (g_s) con su correspondiente ecuación de la recta de regresión ($y = 7.622x - 71.483$) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.824 para 17 grados de libertad, $P < 0.001$ y un coeficiente de correlación de 0.907.

En la Figura 13 se puede observar como en las plantas regadas la tasa de evapotranspiración es significativamente mayor durante todo el periodo de estudio, acrecentándose la diferencia tras el riego. Todo ello sugiere que esta planta tiene un mecanismo eficiente para evitar las pérdidas de agua en condiciones de sequía, y una disminución de la asimilación neta de CO_2 en

las plantas no regadas (Figura 14), que es probablemente el factor limitante de su crecimiento. A la vista de esta Figura 14 se observa la existencia de una época en la cual, tras un riego, el incremento del valor de la asimilación de CO₂ es mayor.

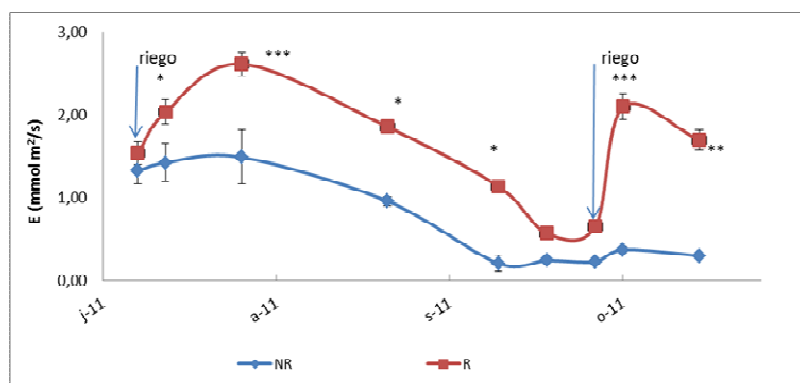


Figura 13. Transpiración de las hojas (E) en plantas no regadas (NR) y plantas regadas (R) Una situación de estrés hídrico conlleva un descenso de la tasa de evapotranspiración. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

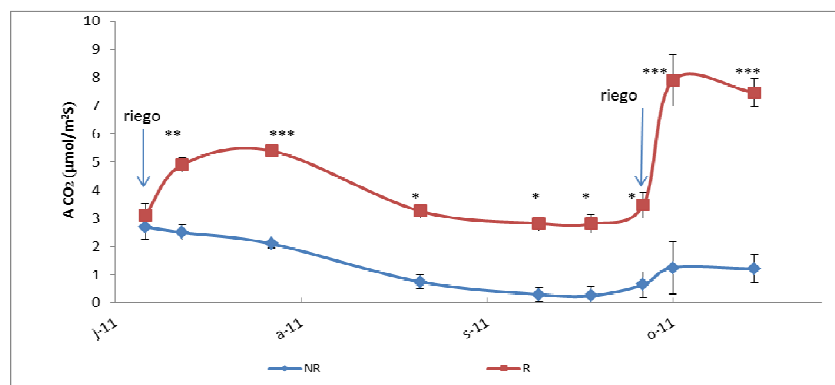


Figura 14. Asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}) en plantas no regadas (NR) y plantas regadas (R) Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

IV. Resultados y Discusión

Al final del experimento, a partir de hojas de plantas regadas y no regadas se estimaron los componentes del potencial hídrico ($\Psi_s = \Psi_\pi + \Psi_t$), así como el potencial osmótico a saturación ($\Psi_{\pi 100}$), representándose gráficamente en las Figuras 15 y 16, respectivamente.

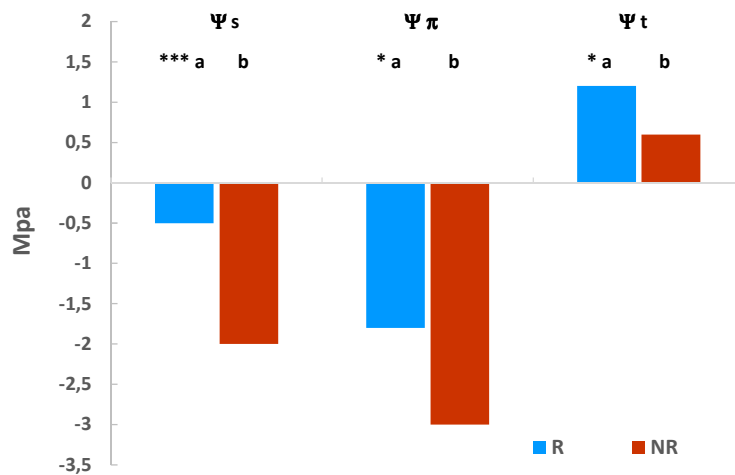


Figura 15. Componentes del potencial hídrico de las hojas (Ψ_s : potencial hídrico; Ψ_π : potencial osmótico; Ψ_t : potencial de turgencia). Significaciones estadísticas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

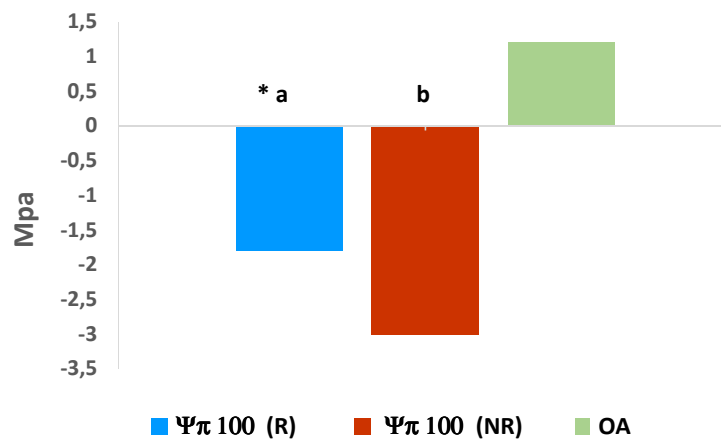


Figura 16. Potencial osmótico de las hojas a plena hidratación ($\Psi_{\pi 100}$) y reajuste osmótico (OA). Significaciones estadísticas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

De la Figura 15 se puede observar que en las plantas no regadas el valor absoluto de ψ_s disminuyó más de 4 veces respecto al de las plantas regadas. No obstante, esta disminución fue compensada parcialmente por una disminución en el potencial osmótico (ψ_π) de las plantas no regadas, que provocó que la turgencia (ψ_t) de las hojas apenas disminuyera con el déficit hídrico, manteniéndose incluso en valores positivos. De la Figura 16 se deduce que la diferencia entre el potencial osmótico a saturación ($\psi_{\pi 100}$) de las hojas procedentes de plantas regadas y no regadas indica que en estas últimas se produce un ajuste osmótico (OA) de aproximadamente 1 MPa, que es suficiente para mantener un adecuado nivel de turgencia en las hojas. Estos resultados concuerdan con las conclusiones realizadas por Downtown [103] sobre el papel regulador del látex en la turgencia, ya que actuaría como un regulador osmótico que mantendría la turgencia de las células laticíferas incluso en situaciones de alto estrés hídrico. Así, este hecho permitiría a la planta tener una alta tolerancia a condiciones climáticas que impliquen una baja pluviosidad.

Por otra parte, los rendimientos de los extractos hexánicos y metanólicos de plantas regadas y no regadas se recogen en la Tabla 13.

tratamiento	Ext. hex (%)		Ext hex/planta (g/planta)	Ext. MeOH (%)		Ext MeOH/planta (g/planta)
	hojas	tallos		hojas	tallos	
NR	14.21 ^a	6.19	5.08 ^b	22.79	18.37 ^a	9.05 ^b
R	7.91 ^b	6.41	7.89 ^a	19.06	13.55 ^b	18.28 ^a
<i>significaciones</i>	***		**		*	***

¹ Ext. hex.: extracto hexánico en % de peso seco.

² Ext. MeOH: extracto metanólico en % de peso seco.

Tabla 13. Rendimiento en extracto hexánico y metanólico con y sin riego (R y NR respectivamente). Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Podemos observar que las hojas de las plantas sometidas a un estrés hídrico intenso muestran un mayor rendimiento de extracto hexánico, es decir, una mayor concentración de compuestos hidrocarbonados con respecto a las plantas regadas, mientras que no se apreciaron diferencias significativas en la concentración total de compuestos extraídos con metanol (tipo carbohidratos) (Tabla 13). Estos resultados sugieren que los componentes del extracto hexánico podrían estar implicados en el ajuste osmótico de las plantas sometidas a estrés hídrico.

En la Figura 17 se demuestra que como consecuencia de la eficacia de los mecanismos que limitan las pérdidas de agua en esta especie (cierre de los estomas y ajuste osmótico), el contenido relativo de humedad en las hojas disminuyó en menos de un 15%, después de un prolongado periodo de sequía.

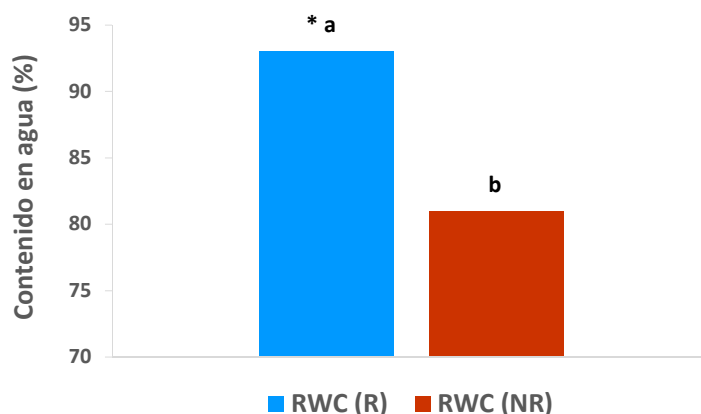


Figura 17. Contenido relativo en agua de las hojas (RWC).

En la Tabla 14 se recogen los datos de crecimiento de las plantas con riego y sin riego. Así, en ausencia de un aporte de agua al suelo durante el

IV. Resultados y Discusión

periodo de máxima actividad vegetativa (abril-noviembre) de *E. characias*, no se observaron los síntomas externos típicos del estrés hídrico, tales como abscisión de hojas o pérdida de turgencia de las mismas. Sin embargo, en estas condiciones se redujo drásticamente el crecimiento de las plantas, observándose significativas diferencias en el crecimiento tanto de la parte aérea como de las raíces de las plantas regadas (Tabla 14).

tratamiento	Peso seco (g)				
	hojas	tallos	raíces	parte aérea	Total planta
NR	31.12 ^b	10.66 ^b	8.18 ^b	41.78 ^b	49.96 ^b
R	68.35 ^a	38.78 ^a	29.12 ^a	107.13 ^a	136.25 ^a
significaciones	***	***	***	***	***

Tabla 14. Crecimiento de las plantas con riego y sin riego (R y NR, respectivamente) Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

En resumen, el estudio de la respuesta de *E. characias* ante un estrés de sequía nos ha permitido demostrar que esta planta presenta unas características compatibles con las tendencias actuales en los cultivos energéticos. Así, la falta de agua durante el periodo de verano, época en la que el déficit hídrico es una condición ambiental muy frecuente, no produce efectos irreversibles en la planta, ya que esta presenta un mecanismo muy eficiente para reducir la pérdida de agua, y un mínimo descenso del contenido en agua del suelo provoca un cierre de los estomas que produce una drástica reducción de la transpiración, con el consiguiente valor adaptativo.

3.2.2. Estudio de la adaptación al suelo y tolerancia a la clorosis férrica

El objetivo de este experimento nos ha permitido evaluar la influencia de distintos tipos de suelos sobre el crecimiento y composición de *E.*

IV. Resultados y Discusión

characias, así como la tolerancia de esta especie a la deficiencia de hierro inducida por la alcalinidad del suelo.

En la Tabla 15 podemos observar que en las plantas crecidas en los suelos 1 y 3 (S1 y S3) existe un mayor desarrollo de los órganos aéreos (hojas y tallos) y de las raíces, en comparación con las plantas crecidas en los suelos 2 y 4 (S2 y S4), aunque dentro de estas plantas crecidas en los suelos arenosos (S1 y S3) existen diferencias significativas (mayor del 200%) entre las raíces de las plantas crecidas a diferentes pH.

tratamiento	Peso seco (g)				
	hojas	tallos	raíces	parte aérea	Total planta
Suelo 1	24.41 ^a	38.02 ^a	57.60 ^a	62.43 ^a	120.03 ^a
Suelo 2	14.36 ^b	19.27 ^b	18.66 ^c	33.63 ^c	52.29 ^b
Suelo 3	22.16 ^a	32.86 ^a	46.25 ^b	55.02 ^a	101.27 ^a
Suelo 4	20.00 ^a	24.75 ^b	16.25 ^c	44.87 ^b	61.01 ^b
<i>significaciones</i>	***	***	***	*	*

Tabla 15. Efecto de diferentes tipo de suelo sobre el crecimiento de las plantas. S1 (pH 8.6) y S-3 (pH 6.3) son arenosos; S-2 (pH 8.4) y S-4 (pH 6.5) son franco-arcillosos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001.

Esto indicaría que estas plantas se adaptan tanto a los suelos alcalinos (S1 y S2 con pH 8.6 y 8.4 respectivamente) como a los suelos ácidos (S3 y S4 con pH 6.3 y 6.5 respectivamente), ya que para una textura semejante no se aprecian diferencias significativas en el peso total de las plantas. No obstante, se aprecia un efecto del tipo de suelo sobre el crecimiento de las plantas, siendo éste marcadamente superior en los terrenos más ligeros (arenosos) que en los más pesados (franco-arcillosos), confirmándose así lo afirmado por diversos autores acerca del mayor crecimiento y desarrollo de las plantas crecidas en suelos arenosos respecto a aquellas cultivadas en suelos arcillosos [113]. Nos atreveríamos a afirmar que esto puede deberse

IV. Resultados y Discusión

al efecto de la textura del suelo sobre el tamaño de los espacios libres entre las diversas partículas que lo forman, lo que podría provocar que las raíces de aquellas plantas que crecen en suelos más pesados tuvieran mayor dificultad para desarrollarse, además de ser más susceptibles a problemas de asfixia radicular. Con estas diferencias en el desarrollo del sistema radicular, resultan lógicas las diferencias significativas que se observan en el total de la parte aérea.

En la Tabla 16 recogemos los datos obtenidos para los rendimientos de los extractos de plantas crecidas en diferentes tipos de suelo.

tratamiento	Ext. hex (%)		Ext hex/planta (g/planta)	Ext. MeOH (%)		Ext MeOH/planta (g/planta)
	hojas	tallos		hojas	tallos	
Suelo 1	10.29	5.26 ^b	4.51 ^a	16.70	6.80	6.66 ^a
Suelo 2	9.89	6.89 ^a	2.74 ^b	14.61	5.41	3.13 ^b
Suelo 3	10.23	5.14 ^b	3.95 ^a	15.53	5.70	5.31 ^a
Suelo 4	8.16	4.95 ^b	2.87 ^b	18.61	5.80	5.15 ^a
<i>significaciones</i>	ns	*	*	ns	ns	***

¹ Ext. hex.: extracto hexánico en % de peso seco.

² Ext. MeOH: extracto metanólico en % de peso seco.

Tabla 16. Rendimiento en extracto hexánico y metanólico de la parte aérea de plantas cultivadas en diferentes tipos de suelos. S1 y S-3 son arenosos; S-2 y S-4 son franco-arcillosos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001.

En vista de los resultados, no se aprecian diferencias significativas debidas al tipo de suelo en la concentración de los extractos hexánico y metanólico en hojas. Sin embargo, se observan diferencias en el rendimiento en extracto hexánico de tallos, esto junto con el mayor peso seco de los tallos con respecto a las hojas hacen que las diferencias en el extracto hexánico por planta sean significativas. En el extracto metanólico no se aprecian diferencias importantes en tallos pero al igual que en el caso anterior, el mayor peso del tallo respecto a las hojas conduce a diferencias

significativas en el rendimiento total de extracto metanólico por planta (Tabla 16). Por tanto, las diferencias en el rendimiento total de la parte aérea de las plantas, se debieron principalmente a la producción de biomasa. Consecuentemente, los rendimientos por planta fueron mayores en los terrenos de textura arenosa. Esto coincidiría en parte con lo afirmado por algunos autores para el caso de *E. lathyris* que concluían que los suelos arenosos favorecían el desarrollo de la planta y por tanto, estas presentaban un mayor peso seco [114,115].

La Tabla 17 permite el análisis de algunos parámetros fisiológicos que normalmente son afectados por la clorosis férrica. Este estudio indicó que esta especie es capaz de absorber cantidades elevadas de Fe con independencia del pH del suelo. Esto se aprecia de las altas concentraciones de este elemento encontradas en las hojas de todos los tratamientos que no indican, en absoluto, la existencia de estados carenciales ya que no existen diferencias significativas en los parámetros ligados a la fluorescencia (Fv/Fm y Fv/Fo) ni en la asimilación de CO₂. La mayor concentración de Fe foliar encontrada en las plantas cultivadas en S-4 se debe posiblemente a una mayor disponibilidad de Fe²⁺ asimilable en este suelo, tanto por su carácter ácido como por su riqueza natural en este elemento aunque, por lo que indican el resto de parámetros, estaría por encima del nivel de saturación.

IV. Resultados y Discusión

tratamiento	Fe (ppm PS hojas)	N (% PS hojas)	clorofilas ($\mu\text{g/mL}$)	Fv/Fm	Fv/Fo	ΔCO_2 (μmol $\text{CO}_2/\text{m}^2\text{s}$)
Suelo 1	608.68 ^b	2.01 ^a	17.31 ^a	0.719	2.86	7.03
Suelo 2	676.41 ^b	1.24 ^b	13.02 ^b	0.721	2.73	5.98
Suelo 3	614.27 ^b	1.97 ^a	16.81 ^a	0.715	2.83	6.25
Suelo 4	971.56 ^a	0.86 ^b	10.19 ^b	0.711	2.67	6.87
significaciones	**	**	**	ns	ns	ns

Tabla 17. Parámetros fotosintéticos en hojas de plantas cultivadas en diferentes tipos de suelo. S1 y S-3 son arenosos; S-2 y S-4 son franco-arcillosos. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

El contenido en clorofila de las hojas mostró marcadas diferencias entre distintos tipos de suelo. Así, los valores fueron superiores en los suelos más ligeros (S-1 y S-3) mientras que en los suelos más pesados (S-2 y S-4) el contenido en clorofila fue menor. Esta observación podría estar relacionada con una menor absorción de N que afectaría a la biosíntesis de la clorofila.

El estado del aparato fotosintético de las hojas no pareció verse especialmente afectado por el tipo de suelo, ya que el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) y la relación entre la fluorescencia variable e inicial (Fv/Fo) no mostró variaciones significativas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la asimilación neta de CO₂ por las hojas entre plantas cultivadas en los diferentes tipos de suelos.

En resumen, el estudio de la respuesta de *E. characias* ante distintos tipos de suelos nos ha permitido demostrar que:

1. Esta planta presenta una alta adaptabilidad a los distintos suelos, tanto alcalinos como ácidos, ya que presenta elevadas concentraciones de Fe en hojas incluso en terrenos marcadamente alcalinos, lo que sugiere una alta eficiencia de asimilación de los nutrientes.

2. Existe una relación entre una menor o mayor absorción de N (que afectaría a la biosíntesis de clorofila) y la textura del suelo. Así, en los suelos franco-arcillosos (S-2 y S-4) parece inhibirse la biosíntesis de clorofila en relación a los suelos arenosos (S-1 y S-3).
3. Esta planta requiere terrenos con buena aireación tanto para un óptimo desarrollo de las raíces como para el buen funcionamiento de las mismas. Esto concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en el estudio de los ecotipos salvajes, donde pudimos ver que los rendimientos en peso seco eran mayores en las plantas crecidas en la sierras de Espadán y Mariola, precisamente las que presentan una mayor proporción de arena en sus suelos.
4. Esta planta tiene una alta tolerancia a las condiciones clorosantes ya que no se observan diferencias significativas entre los distintos valores de asimilación de CO₂ ni entre los valores relacionados con la fluorescencia, parámetros que suelen verse afectados por la clorosis férrica. Esta conclusión concordaría, con lo que afirman diversos investigadores acerca de la posible tolerancia al calcio que presentan algunos ecotipos de *E. thymifolia* [144].

3.2.3. Estudio de tolerancia a la salinidad

El objetivo de este experimento fue evaluar la tolerancia de *E. characias* a la salinidad, determinando la influencia de la concentración de sal en el agua de riego sobre la acumulación de iones salinos tóxicos (Cl⁻ y Na⁺), los parámetros de intercambio gaseoso, las relaciones hídricas, el crecimiento de la planta y el contenido en extractos hexánico (compuestos

IV. Resultados y Discusión

hidrocarbonados, mayoritarios en el látex) y metanólico (tipo carbohidratos).

Los resultados recogidos en la Tabla 18 muestran que la concentración de 100 mM de NaCl en el agua de riego produjo un ligero incremento de la concentración de Cl^- y Na^+ en las hojas (40.2 y 44.2% respectivamente), mientras que la concentración de 200 mM de NaCl incrementó de forma considerable la concentración de ambos iones (6 y 4.25 veces respectivamente). Esto parece indicar que las raíces de esta especie son capaces de excluir en su mayor parte los iones Cl^- y Na^+ cuando el agua de riego presenta una alta concentración de NaCl, tal como 100 mM, aunque este efecto se disipa a concentraciones de sal más elevadas (200 mM). La alta acumulación de iones potencialmente nocivos -como son el Cl^- y el Na^+ - en las hojas, que se produjo con este último tratamiento, causó la aparición de algunos síntomas de toxicidad en estos órganos, tales como manchas amarillas y quemaduras, estos desórdenes fisiológicos se podrían traducir en última instancia en una progresiva disminución del crecimiento y una disminución del rendimiento en frutos en el caso de plantas cultivadas.

tratamiento	Cl^- (%)	Na^+ (%)
Control	1.89	0.52
100 mM	2.65	0.75
200 mM	11.36	2.21
significaciones	***	***

Tabla 18. Efecto de la salinidad sobre la concentración de iones salinos en hojas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05,**p<0.01 y ***p<0.001.

La Tabla 19 permite observar que la salinidad por su efecto osmótico sobre las raíces afecta marcadamente a los parámetros de intercambio

IV. Resultados y Discusión

gaseoso en las hojas, y consecuentemente se produce una disminución de la absorción de CO₂ que al final se traduce en una disminución de la tasa de crecimiento y la productividad, pero ese efecto en la planta es debido más a la inhibición de la capacidad fotosintética que al efecto del estrés osmótico o la disminución de la conductancia estomática [112]. Este efecto fue muy acusado en las plantas regadas con 200 mM de NaCl, donde se apreciaron reducciones del 55, 50 y 65% de la conductancia estomática, transpiración y asimilación neta de CO₂ respectivamente.

tratamiento	gs (mmol/m ² s)	E (mmol/ m ² s)	Δ CO ₂ (μmol CO ₂ /m ² s)
Control	72.91 ^a	2.16 ^a	6.24 ^a
100 mM	59.42 ^b	1.84 ^b	4.98 ^b
200 mM	32.27 ^c	1.09 ^c	2.15 ^c
significaciones	***	*	***

Tabla 19. Efecto de la salinidad sobre los parámetros fotosintéticos en hojas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Además, los resultados de la Tabla 20 muestran que los tratamientos salinos también afectan al potencial del agua de las hojas que disminuye progresivamente con el aumento de la concentración de NaCl en el agua de riego. No obstante esta reducción se compensa por una disminución en paralelo del potencial osmótico, con lo cual el potencial de turgencia no se ve modificado significativamente. Con ello, las hojas no muestran ningún síntoma de marchitez, cumpliéndose así lo que afirman algunos autores acerca de la existencia de mecanismos específicos en la planta para controlar el ajuste osmótico que impedirían o dificultarían la pérdida de agua en la planta [111].

IV. Resultados y Discusión

tratamiento	PH (MPa)	PO (MPa)	PT (MPa)
Control	-1.21 ^a	-2.33 ^a	1.12
100 mM	-1.64 ^a	-2.87 ^a	1.23
200 mM	-2.28 ^b	-3.26 ^b	0.98
significaciones	***	***	ns

Tabla 20. Efecto de la salinidad sobre las relaciones hídricas en hojas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Como consecuencia de todo lo anterior, se estudió el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas así como el efecto de la misma sobre el contenido en compuestos hidrocarbonados (extracto hexánico) y azúcares (extracto metanólico), recogiendo los resultados en las Tablas 21 y 22, respectivamente.

tratamiento	Peso seco (g)				
	hojas	tallos	raíces	parte aérea	Total planta
Control	15.01 ^a	61.10 ^a	13.10 ^a	76.11 ^a	89.04 ^a
100 mM	12.03 ^a	55.30 ^a	11.67 ^a	67.33 ^a	79.00 ^a
200 mM	3.51 ^b	44.01 ^b	5.01 ^b	47.52 ^b	52.51 ^c
significaciones	***	***	***	***	***

Tabla 21. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

tratamiento	Ext. hex (%)		Ext hex/planta (g/planta)	Ext. MeOH (%)		Ext MeOH/planta (g/planta)
	hojas	tallos		hojas	tallos	
Control	8.90 ^c	7.41	5.89 ^a	29.15	15.37	13.81 ^a
100 mM	11.60 ^b	7.25	5.39 ^a	28.40	16.30	12.43 ^a
200 mM	14.51 ^a	6.99	3.58 ^b	27.22	16.94	8.41 ^b
significaciones	***	ns	**	ns	ns	***

¹ Ext. hex.: extracto hexánico en % de peso seco.

² Ext. MeOH: extracto metanólico en % de peso seco.

Tabla 22. Efecto de la salinidad sobre el rendimiento en extracto hexánico y metanólico de la parte aérea de la planta. Cada valor es el resultado de la media de un mínimo de tres plantas independientes (n=3) sometidas al mismo tratamiento. Significaciones estadísticas: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Así, podemos observar que la concentración de NaCl de 100 mM redujo ligeramente el crecimiento de las plantas (en un 11%) mientras que la concentración de 200 mM lo inhibió fuertemente (en un 41%) (Tabla 21). Otras especies de *Euphorbia*, como por ejemplo *E. antisiphilitica*, presentaron una respuesta similar llegando incluso a registrarse un mayor crecimiento de la parte aérea [113]. Por otra parte los datos sobre la concentración de extracto hexánico en % sobre planta seca (Tabla 22) nos permiten pensar que la salinidad aumenta la concentración del extracto hexánico en las hojas, como afirmaron Garg y Kumar [145] con incrementos del 30 y del 63% para los tratamientos con 100 y 200 mM de NaCl respectivamente. Este efecto no se apreció en los tallos. Estos datos confirman que los componentes del extracto hexánico pueden contribuir al ajuste osmótico en las hojas de esta especie como ya sugirieron otros autores para *Nerium oleander* [103]. El incremento en la concentración de este extracto en las hojas salinizadas se vio compensado por el menor crecimiento de las plantas. Así, podríamos decir que para una concentración de NaCl de 100 mM, el rendimiento en extracto hexánico por planta no se vio afectado. La salinidad no afectó a la concentración del extracto metanólico, tanto en hojas como en tallos, y por consiguiente, redujo el rendimiento por planta como consecuencia de la inhibición del crecimiento.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

De los estudios de selección de las especies:

1. Debido a su composición química y características agronómicas, se eligió a *Euphorbia characias* como fuente potencial de biocombustible de entre las diferentes especies de plantas laticíferas de la zona mediterránea. Esta planta mostró un elevado rendimiento en extracto hexánico (compuesto mayoritariamente por derivados hidrocarbonados) y metanólico (compuesto principalmente por carbohidratos).

De los experimentos sobre el estudio de la respuesta a diferentes dosis de riego:

2. Según la curva de crecimiento y los rendimientos de extractos hexánicos y metanólicos de *E. characias* en sus diferentes estados de desarrollo, hemos determinado que el periodo que comprende entre el final de la floración y justo antes de que los frutos maduren, es decir, finales de abril-principios de mayo (fin de la fase II) es el momento óptimo de recolección de la planta para obtener el máximo rendimiento energético por hectárea.
3. En nuestro clima mediterráneo, la dosis de agua óptima para obtener un máximo rendimiento energético corresponde a 445 mm durante un ciclo completo (desde el trasplante hasta abril del siguiente año), repartido en riegos de 15 mm de agua ($150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$). Esto supondría un aporte adicional alrededor de 75 mm de agua anualmente ($750 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$) además del agua de lluvia.

De los experimentos sobre *el estudio de la respuesta ante los diferentes estreses abióticos*:

4. *E. characias* presenta un mecanismo muy eficiente para reducir la pérdida de agua consistente en la rápida activación del cierre de los estomas ante una situación de sequía, provocando una drástica reducción de la transpiración. Por lo tanto, esta planta presenta unas características compatibles con las tendencias actuales en los cultivos energéticos.
5. El rendimiento de extracto hexánico aumenta en plantas sometidas a un estrés hídrico y condiciones de salinidad moderada. Esto demuestra que los compuestos hidrocarbonados mayoritarios del látex, tienen cierto efecto osmótico que actúa como defensa ante la sequedad. Así, sometiendo la planta a condiciones de estrés hídrico y salinidad moderadas podríamos inducir un aumento de la concentración de látex por gramo de peso seco de planta.
6. Se ha propuesto una adecuada periodicidad de riegos para el crecimiento de *E. characias* en clima mediterráneo, donde llueve más al inicio del otoño. Cuatro riegos serán fundamentales con un aporte de $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de agua por cada riego: en abril (coincidiendo con el trasplante), a mediados de junio, a finales o principios de octubre en función de haber tenido lluvias abundantes o no durante el otoño, y finalmente, en la primera quincena de marzo para someter a la planta a un estrés hídrico moderado y así aumentar su rendimiento en látex. El agua restante (70-75%) debería repartirse durante el resto del periodo de crecimiento (de noviembre a abril).

7. En lo que a necesidades de suelo se refiere, esta planta tiene una alta adaptabilidad a los distintos suelos, tanto alcalinos como ácidos, ya que presenta concentraciones elevadas de Fe en hojas, incluso en terrenos marcadamente alcalinos, lo que indica una alta eficiencia de asimilación de los nutrientes. Sin embargo, *E. characias* requiere terrenos con buena aireación tanto para un óptimo desarrollo de las raíces como para el buen funcionamiento de las mismas.
8. Existe una relación entre una menor o mayor absorción de N (que afectaría a la biosíntesis de la clorofila) y la textura del suelo. Así, en los suelos franco-arcillosos (S-2 y S-4) parece inhibirse la biosíntesis de clorofila en relación a los suelos arenosos (S-1 y S-3).
9. *E. characias* muestra una tolerancia elevada frente a las condiciones clorosantes ya que no se observan diferencias significativas entre los distintos valores de asimilación de CO₂ ni entre los valores relacionados con la fluorescencia, parámetros que son afectados por la clorosis férrica.
10. También *E. characias* presentó una alta tolerancia a la salinidad. A concentraciones de NaCl de 100 mM en el agua de riego, el extracto hexánico en hojas aumentó un 30 % aunque se produjo un ligero descenso del crecimiento, compensando el rendimiento en extracto hexánico por planta. Podemos decir que, las raíces de *E. characias* son capaces de excluir la mayor parte de los iones nocivos, Na⁺ y Cl⁻. Sin embargo, este efecto se perdió a concentraciones más altas de 200 mM donde a pesar del elevado incremento en el rendimiento de extracto hexánico de hojas (63 %), se produjo una drástica inhibición del

crecimiento de la planta, reduciéndose casi a la mitad el rendimiento de extracto hexánico por planta.

11. Este estudio nos permite estimar que recolectado a finales de abril-principios de mayo, se puede podrían obtener hasta 22000 kg de materia seca por hectárea de los cuales alrededor de 1300 kg serían de compuestos hidrocarbonados extraíbles en n-hexano, directamente convertibles en biocombustible en una refinería convencional; 4300 kg serían de extracto metanólico formado mayoritariamente por carbohidratos fácilmente fermentables. El resto de la materia seca sería un residuo lignocelulósico también utilizable como fuente de energía.

VI. BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] M.F. Demirbas. Current technologies for biomass conversion into chemicals and fuels. *Energy Sources. Part A* **2006**, 28, 1181-1188.
- [2] S.N. Naik, V.V. Goud, P.K. Rout, A.K. Dalai. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, 14, 578-597.
- [3] A.F. Turhollow, E.O. Heady. Large-scale ethanol production from corn and grain sorghum and improving conversion technology. *Energy Agric.* **1986**, 5, 309-316.
- [4] R. Zhao, S.R. Bean, D. Wang, S.H. Park, T.J. Schober, J.D. Wilson. Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorghum grain. *J. Cereal Sci.* **2009**, 49, 230-238.
- [5] I.M. Banat, P. Nigam, R. Marchant. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, 8, 259-263.
- [6] G. Love, S. Gough, D. Brady, N. Barron, P. Nigam, D. Singh, R. Marchant, A.P. McHale. Continuous ethanol fermentation at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate and kissiris. *Bioproc. Eng.* **1998**, 18, 187-189.
- [7] A. Demirbas. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers. Manage.* **2009**, 50, 14-34.
- [8] G.W. Huber, S. Iborra, A. Corma. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts and engineering. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 4044-4098.
- [9] G.J. Monteny, A. Bannink, D. Chadwick. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agr. Ecosyst. Environ.* **2006**, 112, 163-170.
- [10] P.S. Nigam, A. Singh. Production of liquid fuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2011**, 37, 52-68.
- [11] A. Demirbas. Competitive liquid biofuels from biomass. *Appl. Energy* **2011**, 88, 17-28.
- [12] L. Brennan, P. Owende. Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and coproducts. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, 14, 557-577.

-
- [13] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 217-232.
- [14] R. Luque. Algal biofuels: the eternal promise? *Energy Environ. Sci.* **2010**, *3*, 254-257.
- [15] W.N. Rowlands, A. Masters, T. Maschmeyer. The biorefinery-challenges, opportunities and an Australian perspective. *Bull. Sci. Technol. Soc.* **2008**, *28*, 149-158.
- [16] R.J. Farrauto, C.H. Bartholomew. Fundamentals of industrial catalytic processes. Chapman & Hall, London, UK; 1997.
- [17] P.L. Spath, D.C. Dayton. Preliminary screening-technical and economic assessment of synthesis gas to fuels and chemicals with emphasis on the potential for biomass-derived syngas. NREL Technical Report NREL/TP-510-34929; Golden, CO; National Renewable Energy Laboratory; 2003.
- [18] H.R. Appell, Y.C. Fu, S. Friedman, P.M. Yavorsky, I. Wender. Technical report of investigation 7560. US Bureau of Mines, Pittsburgh; 1971.
- [19] Y. Sun, J. Cheng. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Technol.* **2002**, *83*, 1-11.
- [20] H.K. Sodhi, K. Sharma, J.K. Gupta, S.K. Soni. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 525-534.
- [21] S. Lee, J.G. Speight, S.K. Loyalka. Handbook of alternative fuel technologies CRC Taylor and Francis Group, USA; 2007.
- [22] C.E. Wyman, S.R. Decker, M.E. Himmel, J.W. Brady, C.E. Skopec, L. Viikari. Hydrolysis of cellulose and hemicelluloses. En: *Polysaccharides*; S. Dumitriu, Ed.; Marcel Dekker, USA: New York; 2005; pp 995-1034.
- [23] F.E.I. Deswarte, J.H. Clark, A.J. Wilson, J.J.E. Hardy, R. Marriott, S.P. Chahal, C. Jackson, G. Heslop, M. Birkett, T.J. Bruce, G. Whiteley. Toward an integrated straw-based biorefinery. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2007**, *1*, 245-254.

- [24] J.H. Clark, V. Budarin, F.E.I. Deswarte, J.J.E. Hardy, F.M. Kerton, A.J. Hunt, R. Luque, D.J. Macquarrie, K. Milkowski, A. Rodriguez, O. Samuel, S.J. Tavener, R.J. White, A.J. Wilson. Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future. *Green Chem.* **2006**, *8*, 853-860.
- [25] S. Saka, K. Ehara, S. Sakaguchi, K. Yoshida. Useful products from lignocellulosics by supercritical water technologies. En: *The second joint international conference on sustainable energy and environment*; 2006; pp 485-489.
- [26] A. Loppinet-Serani, C. Aymonier, F. Cansell. Current and foreseeable applications of supercritical water for energy and the environment. *ChemSusChem.* **2008**, *1*, 486-503.
- [27] T. Kalnes, T. Marker, D.R. Shonnard. Green Diesel: a second generation biofuel. *Int. J. Chem. React. Eng.* **2007**, *5*, A48.
- [28] J. Biswas, I.E. Maxwell. Recent process- and catalyst-related developments in fluid catalytic cracking. *Appl. Catal.* **1990**, *63*, 197-258.
- [29] N.Y. Chen, T.F. Degnan, L.R. Koenig. Liquid fuel from carbohydrates. *Chemtech.* **1986**, *16*, 506-511.
- [30] A. Corma, G.W. Huber. Synergies between bio- and oil refineries for the production of fuels from Biomass. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7184-7201.
- [31] C.C. Chang, S.W. Wan. China's motor fuels from tung oil. *Ind. Eng. Chem.* **1947**, *39*, 1543-1548.
- [32] T.Y. Leng, A.R. Mohamed, S. Bhatia. Catalytic conversion of palm oil to fuels and chemicals. *Can. J. Chem. Eng.* **1999**, *77*, 156-162.
- [33] J. Piskorz, P. Majerski, D. Radlein, D.S. Scott. Conversion of lignins to hydrocarbon fuels. *Energy Fuels* **1989**, *3*, 723-726.
- [34] P.M. Train, M.T. Klein. Hydroprocessing lignin and lignin model compounds: products, kinetics and catalyst aging. *Fuel Sci. Technol.* **1991**, *9*, 193-227.
- [35] M.A. Ratcliff, D.K. Johnson, F.L. Posey, H.L. Chum. Hydrodeoxygenation of lignins and model compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1988**, *17*, 151-160.

- [36] A. Oasmaa, R. Alen, D. Meier. Catalytic hydrotreatment of some technical lignins. *Biores. Technol.* **1993**, *43*, 189-194.
- [37] I. Lewandowski; J.C. Clifton-Brown; J.M.O. Scurlock; W. Huisman. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass Bioenergy* **2000**, *19*, 209-227.
- [38] M. Walsh, S. McCarthy. *Miscanthus handbook*. En: *Biomass for Energy and Industry*, Proceedings of 10th EU Bioenergy Conference, Wurzburg, Germany, C.A.R.M.E.N. Publishers; Rimpfar, Germany; 1998; pp 1071-1074.
- [39] DEFRA 2007. Planting and growing *Miscanthus*. *Department for Environment, Food and Rural Affairs*. England. Disponible en: <http://www.naturalengland.org.uk>
- [40] D. Christian; A.R. Riche; N.E. Yates. Evaluation of some herbaceous grasses as biomass crops in southern England. En: *Conference Proceedings: Alternative Crops for Sustainable Agriculture*. European Commission, Turku, Finland; 1999; pp 58-69.
- [41] ADAS 2006. Reducing establishment cost and increasing establishment success in *Miscanthus*. Final report, DTI, 2006. Disponible en: <http://www.berr.gov.uk/files/file37692.pdf>
- [42] R. Pude, H Franken, W. Diepenbrock, J.M. Greef. Ursachen der Auswinterung von einjährigen *Miscanthus*-Beständen. *Pflanzenbauwissenschaften* **1997**, *1*, 171-176.
- [43] M. Mantineo; G.M. D'Agosta; V. Copani; C. Patané; S.L. Cosentino. Biomass yield and energy balance of three perennial crops for energy use in the semi-arid Mediterranean environment. *Field Crops Research* **2009**, *114*, 204-213.
- [44] M.A. Sanderson, R.L. Reed, S.B. McLaughlin, S.D. Wullschleger, B.V. Conger, D.J. Parrish, D.D. Wolf, C. Taliaferro, A.A. Hopkins, W.R. Ocumpaugh, M.A. Hussey, J.C. Read, C.R. Tischler. Switchgrass as a sustainable bioenergy crop. *Biores. Technol.* **1996**, *56*, 83-93.
- [45] H.W. Elbersen, D.G. Christian, N. El Bassam, E.P.V. Alexopoulou, V. Pigniatelli, D. van den Berg. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) as an alternative energy crop in Europe. Iniciation of a productivity network. Final Report FAIR 5-CT97-3701. Disponible en: www.switchgrass.nl

-
- [46] S.Kim, B.E. Dale. Cumulative energy and global warming impact from the production of biomass for biobased products. *J. Ind. Ecol.* **2004**, 7, 147-162.
- [47] M.R. Schmer, K.P. Vogel, R.B. Mitchell, R.K. Perrin. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 464-469.
- [48] R. Samson, C.H. Lem, S.B. Stamler, J. Dooper. Developing Energy Crops for Thermal Applications: Optimizing Fuel Quality, Energy Security and GHG Mitigation. En: *Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems*. D. Pimentel. (Ed.) Springer Science, Netherlands; 2008; pp 395-423.
- [49] A. Karacic; T. Verwijst; M. Weih. Above-ground woody biomass production of short-rotation of *Populus* plantations on agricultural land in Sweden. *Scand. J. Forest Res.* **2003**, 18, 427-437.
- [50] M.J. Aylott, E. Casella, I. Tubby, N.R. Street, P. Smith, G. Taylor. Yield and spatial supply of bioenergy poplar and willow short-rotation coppice in the UK. *New Phytol.* **2008**, 178, 358-370.
- [51] G.E. Scaracia-Mugnozza, R. Ceulemans, P.E. Heilman, J.G. Isebrands, R.F. Stettler, T.M. Hinckley. Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. II. Biomass components and harvest index of hybrid and parental species clones. *Can. J. Forest Res.* **1997**, 27, 285-294.
- [52] W.M.J. Achten, E. Mathijs, L. Verchot, V.P. Singh, R. Aerts, B. Muys. *Jatropha* biodiesel fueling sustainability?. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2007**, 1, 283-291.
- [53] J. Heller. Physic nut, *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. PhD dissertation; Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany; and International Plant Genetic Resource Institute, Rome, Italy; 1996.
- [54] N. Foidl, G. Foidl, M. Sanchez, M. Mittelbach, S. Hackel. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. *Biores. technol.* **1996**, 58, 77-82.
- [55] K. Openshaw. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy* **2000**, 19, 1-15.

-
- [56] W.M.J. Achten, L. Verchot, Y.J. Franken, E. Mathijs, V.P. Singh, R. Aerts, B. Muys. *Jatropha* bio-diesel production and use (a literature review). *Biomass Bioenergy* **2008**, 32, 1063-1084.
- [57] N. Kaushik, S. Kumar. *Jatropha curcas* L. silviculture and uses. Agrobios Publisher, Jodhpur, India; 2006.
- [58] J. Chikara, A. Ghosh, J.S. Patolia, D.R. Chaudhary, A. Zala. Productivity of *Jatropha curcas* under different spacing. En: *FACT* seminar on *Jatropha curcas* L. agronomy and genetics, Wageningen, The Netherlands, March 26–28. Wageningen: FACT Foundation; 2007 Article no.9.
- [59] N. Foidl; P. Eder. Agro-industrial exploitation of *J. curcas*. G.M. Gübitz, M. Mittelbach, M. Trabi (Eds.), *Biofuels and industrial products from Jatropha curcas*. Proceedings from the symposium “*Jatropha 97*”, Managua, Nicaragua, Feb 23–27, Dbv-Verlag, Graz, Austria; 1997; pp 88-91.
- [60] R.E.E. Jongschaap; W.J. Corré; P.S. Bindraban; W.A. Brandenburg. Claims and facts on *Jatropha Curcas* L. En: *Global Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Report 158. Plant Research International, Wageningen U.R.; 2007.
- [61] Y. Chisti. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **2007**, 25, 294-306.
- [62] A. Banerjee, R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, 22, 245-279.
- [63] Y. Chisti. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* **2008**, 26, 126-131.
- [64] P.T. Pienkos, A. Darzins. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2009**, 3, 431-440.
- [65] Y. Zhang, M.A. Dubé, D.D. McLean, M. Kates. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Biores. Technol.* **2003**, 89, 1-16.
- [66] Y. Zhang, M.A. Dubé, D.D. McLean, M. Kates. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assesment and sensitivity analysis. *Biores. Technol.* **2003**, 90, 229-240.

-
- [67] M. Calvin. Petroleum plantation for fuel and materials. *Bioscience* **1979**, *29*, 533-538.
- [68] M. Calvin. Photosynthesis as a resource for energy and materials. *Photochem. Photobiol.* **1976**, *23*, 425-444.
- [69] M. Calvin. Hydrocarbons via photosynthesis. *Int. J. Energy research* **1977**, *1*, 299-327.
- [70] M. Calvin. Fuel oils from Euphorbs and other plants. *Botanical J. Linn. Soc.* **1987**, *94*, 97-110.
- [71] M. Calvin. Hydrocarbon from plants: analytical methods and observations. *Naturwissenschaften* **1980**, *67*, 525-533.
- [72] R.A. Buchanan, I.M. Cull, F.H. Otey, C.R. Russell. Hydrocarbon and rubber producing crops. Evaluation of U.S. plant species. *Econ. Bot.* **1978**, *32*, 131-145.
- [73] Castroviejo, S. (coord. gen.). *Flora ibérica*. 1986-2012. Plantas vasculares de la Península Ibérica y Baleares. Real Jardín Botánico, CSIC; Madrid.
- [74] R.F. Ward. Euphorbia: is it the source of hydrocarbons in the future? *Solar Energy* **1982**, *29*, 83-86.
- [75] E.K. Nemethy, J.W. Otvos, M. Calvin. Analysis of extractables of one euphorbia. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, *56*, 957-960.
- [76] W.O. Haag, P.G. Rodewald, P.B. Weisz. Catalytic production of aromatics and olefins from plant materials. Symposium on alternate feedstock for petrochemicals. Presented before the division of petrochemical chemistry, Inc. American Chemical Society; August 24-29; San Francisco 1980.
- [77] P.B. Weisz, W.O. Haag, P.G. Rodewald. Catalytic production of high-grade fuel (gasoline) from biomass compounds by shape-selective catalysis. *Science* **1979**, *206*, 57-58.
- [78] V.K. Bhatia, K.G. Mittal, R.P. Mehrotra, V.K. Garg, M. Mehrotra, R.K. Sarin, V.B Kapoor, S.C. Gupta. Catalytic conversion of *Euphorbia neriifolia* biocrude into petroleum hydrocarbons. *Fuel* **1988**, *67*, 1708-1709.
- [79] K.V. Padmaja, N. Atheya, A.K. Bhatnagar. Upgrading of Candelilla biocrude to hydrocarbon fuels by fluid catalytic cracking. *Biomass Bioenergy* **2009**, *33*, 1664-1669.

-
- [80] J.L. Tenorio-Pasamón. Productividad de *Euphorbia lathyris* en función del suministro hídrico y otras condiciones de cultivo. 1985. Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S. de Ingenieros Agrónomos (Tesis doctoral).
- [81] J.E. Sandoval Illescas. Hydrocarbon production and growth of *Euphorbia lathyris*: a water use study. 1981. University of Arizona (Tesis de máster).
- [82] F.S. Davies, L.G. Albrigo. 1994 *Citrus*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK
- [83] T.R. Sinclair, L.H. Allen Jr. Carbon dioxide and water vapour exchange of leaves on field-grown citrus trees. *J. Exp. Bot.* **1982**, *33*, 1166-1175.
- [84] J.P. Syvertsen, J. Lloyd, P.E. Kriedmann. Salinity and drought stress effects on foliar ion concentration, water relations, and photosynthetic characteristics of orchard citrus. *Aust. J. Agr. Res.* **1988**, *39*, 619–627.
- [85] A. Gómez-Cadenas, F.R. Tadeo, M. Talón M, E. Primo-Millo. Leaf abscission induced by ethylene in water stressed intact seedling of Cleopatra Mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 404-408.
- [86] V. Arbona, D.J. Iglesias, J. Jacas, E. Primo-Millo, M. Talón, A. Gómez-Cadenas. A hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. *Plant Soil* **2005**, *270*, 73-82.
- [87] F.García-Sanchez, J.P. Syvertsen, V. Gimeno, P. Botia, J.G. Pérez-Pérez. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiol Plant.* **2007**, *130*, 532-542.
- [88] D. Tudela, E. Primo-Millo. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol.* **1992**, *100*, 131-137.
- [89] N.C. Turner. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. Mussell, H, Staples RC (Eds.). En: *Stress Physiology in crop plants*. Wiley, New York; 1979; pp. 343-372.

-
- [90] W.J. Davies, J. Zhang. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol* **1991**, *42*, 55-76.
- [91] J.P. Comstock. Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 195-200.
- [92] R.H. Hilgeman, W.L. Ehrlert, C.E. Everling, F.O. Sharp. Apparent transpiration and internal water stress in Valencia oranges as affected by soil water, season and climate. *Proc. First Int. Citrus Symp.* **1969**, *3*, 1713-1724.
- [93] J.A. Zeevaart, J.S. Boyer. Accumulation and transport of abscisic acid and its metabolites in *Ricinus* and *Xanthium*. *Plant Physiol* **1984**, *74*, 934-939.
- [94] J. Zhang, W.J. Davies. Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. *J Exp. Bot.* **1987**, *38*, 2015-2023.
- [95] J. Zhang, W.J. Davies. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell Environ.* **1989**, *12*, 73-81.
- [96] J. Zhang, W.J. Davies. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant Cell Environ.* **1990**, *13*, 277-285.
- [97] S. Wilkinson. pH as a stress signal. *Plant Growth Regul.* **1999**, *29*, 87-99.
- [98] M. Sánchez-Díaz, M. Pardo, M. Antolín, J. Peña, J. Aguirreolea. Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis. *Plant Sci.* **1990**, *71*, 215-221.
- [99] J. Zhang, W.J. Davies. Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behaviour of sunflower plants. *New Phytol.* **1989**, *113*, 167-174.
- [100] S.D. McNeil, M.L. Nuccio, A.D. Hanson. Betaines and related osmoprotectants: targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **1999**, *120*, 945-949.

- [101] J.G. Pérez-Pérez. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiol. Plant* **2007**, *130*, 532-542.
- [102] Y.B. Lei, C.Y. Yin, C.Y. Li Differences in some morphological, physiological, and biochemical, responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiol. Plant* **2006**, *127*, 182-191.
- [103] W.J.S. Downton. Water Relations of Laticifers in *Nerium oleander*. *Aust. J. Plant. Physiol.* **1981**, *8*, 329-334.
- [104] E.V. Maas, G.J. Hoffman. Crop salt tolerance current assessment. *ASCE J. Irrig. Drain* **1977**, *103*, 115-134.
- [105] Y. Levy, J.P. Syvertsen. Water relations of citrus in climates with different evaporative demands. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. Tokio (Japón) **1981**, *2*, 501-503.
- [106] Y. Levy, J.P. Syvertsen. Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. *Hort. Rev.* **2004**, *30*, 37-82.
- [107] A.A. Murkute, S. Sharma, S.K. Singh Citrus in terms of soil and water salinity: a review. *J. Sci. Ind. Res.* **2005**, *64*, 393-402.
- [108] L. Bernstein. Osmotic Adjustment of Plants to Saline Media. I. Steady State. *Am. J. Bot.* **1961**, *48*, 909-918.
- [109] W.C. Cooper, A.V. Shull. Salt tolerance and accumulation of sodium and chloride ions in grapefruit on various rootstocks grown in naturally saline soil. *Proc. Rio Grande Valley Hortic. Inst.* **1953**, *7*, 107-117.
- [110] M.H. Behboudian, E. Törökfalvy, R.R. Walker. Effects of salinity on ionic content, water relations and gas exchange parameters in some citrus scion-rootstocks combinations. *Scientia Hortic.* **1986**, *28*, 106-116.
- [111] R.R. Walker, E. Törökfalvy, A.M. Grieve, L.D. Prior. Water relations and ion concentrations of leaves on salt stressed citrus plants. *Austr. J. Plant Physiol.* **1983**, *10*, 265-277.
- [112] J. Bañuls, E. Primo-Millo. Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of citrus plants. *Physiol. Plant* **1992**, *86*, 115-123.

- [113] S. Johari, S. Roy, A. Kumar. Influence of edaphic and nutritional factors on growth and hydrocarbon yield of *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. En: *Proc. Biomass for Energy and Industry. Vol. I.* G. Grassi, G. Gosse and G. das Santos (Eds.). Elsevier Applied Science, London 1990; pp. 1522-1526.
- [114] J. Garg, A. Kumar. Improving the growth and hydrocarbon yield of *Euphorbia lathyris* L. in semi-arid regions of Rajasthan. En: *Biomass for Energy and Industry Vol. I.* G. Grassi, G. Gosse and G. dos Santos, (Eds.) Elsevier Applied Science, London 1990; pp. 1527-1531.
- [115] A. Kumar, J. Garg. Effect of organic manures on growth and hydrocarbon yield of *Euphorbia lathyris* L. *J. Environment & Pollution* **1995**, 2, 207-210.
- [116] El medi natural del Bages. Índice de especies. En: *Institucion Catalana de historia natural-Instituto de estudios catalanes*. Disponible en: <http://ichn.iec.cat/bages/brolles>.
- [117] Comunitat Valenciana. En: *Herbario virtual del Mediterráneo Occidental*. Area de Botánica, Departamento de Biología, Universitat de les Illes Balears. Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es>.
- [118] Flora Arvensis de Navarra. En: Herbario de la Universidad pública de Navarra. Disponible en: <http://www.unavarra.es/herbario>.
- [119] E.K. Nemethy, E.S. Lipinsky. Biochemicals as an energy resource. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **1984**, 2, 117-129.
- [120] R.P. Adams; J.D. McChesney. Phytochemicals for liquids fuels and petrochemical substitutions: Extraction procedures and screening results. *Economic Botany* **1983**, 37, 207-215.
- [121] W.B. Dunn, N.J.C. Bailey, H.E. Johnson. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* **2005**, 130, 606–625.
- [122] T.A. van Beek. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *J. Chromatogr. A* **2002**, 967, 21-55.
- [123] L.S. Allen, C.L. Wrzesinski, W.F. Feely, G.A. Doss, L.S. Crouch. Incorporation of Emamectin Benzoate (MK-0244) Residues into Soluble Sugars of Plants. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4131-4136.
- [124] A.I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *J. Chromatogr. B* **2011**, 879, 1226-1240.

- [125] N.C. Turner. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* **1981**, 58, 339-366.
- [126] T.C. Hsiao. Measurements of plant water status. En: *Irrigation of agricultural crops*. B.A. Steward, D.R. Nielsen (Eds). American Society of Agronomy. Agronomy monograph N°. 30. Madison, Wisconsin; 1990; pp 243-279.
- [127] P.J. Van Soest, J.B. Robertson, B.A. Lewis. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**, 74, 3583-3597.
- [128] W. Horwitz. Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists AOAC International. P. Cunniff (Ed.); 16 th Edition; Washington DC, 1995; Vol. 1.
- [129] J.M. Morgan. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1984**, 35, 299-319.
- [130] R. Moran, D. Porath. Chlorophyll determination in intact tissues using *N,N*-dimethylformamide. *Plant Physiol.* **1980**, 65, 478-479.
- [131] J.W. Gilliam. Rapid measurement of chloride in plant materials. *Proc. Am. Soc. Soil Sci.* **1971**, 35, 512-513.
- [132] L. Conti, M. Marchetti, F. Soccolini, M. Usai. Annual changes in the composition of the unsaponifiable oil of *Euphorbia characias*. *Phytochemistry* **1990**, 29, 77-79.
- [133] H. Hemmers, P.G. Gidlz. Epicuticular waxes from leaves of five *Euphorbia* species. *Phytochemistry* **1986**, 25, 2103-2107.
- [134] M.J.U. Ferreira, A.M. Madureira, J.R. Ascenso. A tetracyclic diterpene and triterpenes from *Euphorbia segetalis*. *Phytochemistry* **1998**, 49, 179-183.
- [135] E.M.C. Lima, J.M.R. Medeiros, L.B. Davin. Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry* **2003**, 63, 421-425.
- [136] V. Anjaneyulu, K. Ravi. Terpenoids from *Euphorbia antiquorum*. *Phytochemistry* **1989**, 28, 1695-1697.
- [137] Holden, A. N. G.; Mahlberg, P. G. Application of chemotaxonomy of leafy spurges (*Euphorbia* spp.) in biological control. *Can. J. Bot.* **1992**, 70, 1529-1536.

-
- [138] Appendino, G.; Della Porta, C.; Conseil, G.; Sterner, O.; Mercalli, E.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. A new P-glycoprotein inhibitor from the Caper Spurge (*Euphorbia lathyris*). *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 140-142.
- [139] F. Coppola, A. Brunori. The effect of the herbicide GRAMIXEL on the heptane fraction of Euphorbia biomass. *Biomass* **1984**, *4*, 59-68.
- [140] A. Sturm. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 1-7.
- [141] A. Demirbas. Relationships between lignin contents and heating values of biomass. *Energ. Convers. Manage.* **2001**, *42*, 183-188.
- [142] A. Dermirbas. Calculation of higher heating values of biomass fuels. *Fuel* **1997**, *76*, 431-434.
- [143] P. McKendry. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Biores. Technol.* **2002**, *83*, 37-46.
- [144] P. S. Ramakrishnan. Studies on Edaphic Ecotypes in *Euphorbia Thymifolia* L.: I. Seed Germination. *J. Ecol.* **1965**, *53*, 157-162.
- [145] J. Garg, A. Kumar. Influence of salinity on growth and hydrocarbon yield of *Euphorbia lathyris*. *J. Indian Bot. Soc.* **1989**, *68*, 201-204.

VII. RESÚMENES

1. Resumen

La excesiva dependencia del petróleo en nuestra sociedad, un recurso natural no renovable, ha provocado en los últimos años un interés creciente en los biocombustibles. Esto se ha traducido principalmente en un impulso en la investigación de las tecnologías destinadas en convertir los recursos vegetales en combustibles. Sin embargo, las fuentes de biocombustibles compiten generalmente en recursos (tierra y agua) con los cultivos destinados a la alimentación, siendo imprescindible la búsqueda de cultivos energéticos sostenibles y con pocos requerimientos de riego y fertilización.

El látex es un líquido blanco y viscoso de composición similar a la del crudo de petróleo (compuestos hidrocarbonados), el cual puede convertirse en combustible utilizando las instalaciones de las refineries convencionales. Las plantas laticíferas son abundantes en el entorno mediterráneo, y por tanto muy adaptadas a condiciones climáticas semiáridas. En los años 70, Melvin Calvin inició una investigación sobre diversas plantas del género *Euphorbia*, con el propósito de averiguar el rendimiento potencial en producción de látex.

En la presente tesis doctoral, se ha seleccionado *E. characias* por su composición química y características agronómicas, de entre diversas especies potenciales bioenergéticamente de plantas laticíferas de la zona mediterránea. De esta especie se ha estudiado su rendimiento potencial en Kg ha⁻¹ de látex en distintas condiciones edafológicas, de riego y de salinidad, para determinar cuáles son las condiciones óptimas de cultivo de esta planta y como reacciona frente a condiciones adversas.

Los resultados han mostrado que *E. characias* podría proporcionar una producción de 5600 Kg ha⁻¹ de materiales transformables en combustibles,

de los cuales 1300 Kg ha⁻¹ corresponderían a compuestos hidrocarbonados del látex, y 4300 Kg ha⁻¹ serían carbohidratos fácilmente fermentables en etanol. Puesto que se trata de una planta muy adaptada al entorno mediterráneo, consideramos que *E. characias* es un candidato potencial como fuente de cultivo energético eficiente y sostenible.

2. Resum

L'excessiva dependència del petroli en la nostra societat, així com el fet de que este siga un recurs natural no renovable, ha conduït durant els últims anys a un interès creixent pels biocombustibles. Açò, s'ha traduït fonamentalment en un impuls en la investigació de les tecnologies destinades a convertir recursos vegetals en combustibles. No obstant, estes fonts competixen generalment en recursos (terra i aigua) amb els cultius destinats a l'alimentació, per tant es fa imprescindible la recerca de cultius energètics sostenibles i amb pocs requeriments de reg i fertilització.

El làtex és un líquid blanc i viscos, molt semblant al cru de petroli (compostos hidrocarbonats), el qual pot convertir-se en combustible utilitzant les instal·lacions de les refineries convencionals. Les plantes laticíferes són abundants en l'entorn mediterrani i per tant molt adaptades a condicions climàtiques semi-àrides. En els anys 70, Melvin Calvin va iniciar una investigació de diverses plantes del gènere *Euphorbia*, amb el propòsit d'esbrinar el rendiment potencial en producció de làtex.

En aquesta tesi doctoral, hem seleccionat *E. characias* per la seua composició química i les seues característiques agronòmiques, d'entre diverses espècies bioenergèticament potencials de la zona mediterrània. Sobre esta planta s'ha investigat el seu rendiment potencial en Kg ha⁻¹ de

látex en distintes condicions edafològiques, de reg i de salinitat per tal de determinar quines són les seues condicions òptimes de conreu i com reacciona davant les condicions adverses.

Segons els resultats obtinguts, podríem estimar que *E. characias* donaria una producció de 5600 Kg ha⁻¹ de materials transformables en combustibles, d'els quals 1300 Kg ha⁻¹ serien de compostos hidrocarbonats del látex i 4300 Kg ha⁻¹ correspondrien a carbohidrats fàcilment fermentables i transformables en etanol. Així, *E. characias* es tracta d'una planta molt adaptada a l'entorn mediterrani i podria considerar-se un candidat potencial com cultiu d'energia eficient i sostenible.

3. Abstract

Interest in biofuels has grown in the recent years due to the excessive dependence of our society on oil, a non-renewable natural resource. Consequently, the research has been focused on technologies based on converting plant resources into fuels. However, plant sources generally compete on resources with food crops (land and water), so it is essential to find new, sustainable and efficient energy crops with few irrigation and fertilization requirements.

Latex is a viscous white liquid possessing a similar composition to the crude oil (mainly hydrocarbon compounds) which can be processed using the conventional refinery technologies. Latex-bearing plants are abundant in the Mediterranean area and therefore well adapted to semi-arid climatic conditions. In the 70's, Melvin Calvin began an investigation of various plants of the genus *Euphorbia* in order to ascertain the potential yield in latex production.

In this thesis, the latex bearing plant *E. characias* has been selected among several bio-energetically potential species of the Mediterranean region due to its chemical composition and agronomical qualities. The potential yield of latex in Kg ha^{-1} under different soil conditions, irrigation and salinity has been studied in order to establish the optimum growing conditions and to determine its reaction against environmental changes.

The results showed that *E. characias* would provide a production of 5600 Kg ha^{-1} of biomass directly convertible into combustible. Among them, 1300 Kg ha^{-1} may be hydrocarbons from latex, and 4300 Kg ha^{-1} the readily fermentable carbohydrates into ethanol. Being a well-adapted plant to the Mediterranean climatic conditions we consider this plant a potential candidate for being used as a source of sustainable and efficient energy crop.