

BIOMASA DE *Urochloa brizantha* cv. Toledo COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

BIOMASS OF *Urochloa brizantha* cv. Toledo AS RAW MATERIAL FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Mario A. Santiago-Ortega¹, José A. Honorato-Salazar², Adrián R. Quero-Carrillo¹, Alfonso Hernández-Garay^{1*},
Cándido López Castañeda¹, Isaías López-Guerrero³

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera Federal México-Texcoco. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México. (hernan@colpos.mx). ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental, San Martinito. Km 56.5 Carretera Federal México-Puebla, San Martinito, Tlahuapan, 74100 Puebla, México. (honorato.amador@ini-fap.gob.mx). ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental, La Posta. Km. 22.5 Carretera Veracruz-Córdoba, Col. Paso del Toro, Medellín de Bravo, 94277, Veracruz, México.

RESUMEN

La evaluación de pastos de crecimiento rápido y rendimiento alto de biomasa ha aumentado en el mundo porque son cultivos energéticos potenciales para producir bioetanol de segunda generación. En México se inician estudios en pastos con producción alta de biomasa para usarlos en la producción de biocombustibles. El objetivo de este estudio fue evaluar la biomasa de *Urochloa brizantha* cv. Toledo, como materia prima para la producción de bioetanol. La producción anual de biomasa, el poder calorífico, la composición química, el análisis inmediato y el rendimiento teórico de bioetanol se determinaron en seis frecuencias de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 d después del rebrote). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM (SAS) y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El contenido mayor de hemicelulosas y celulosa ($p \leq 0.05$) fue 30.1 y 44.1 % a los 60 y 150 d del corte. El contenido menor de lignina ($p \leq 0.05$) fue 16.2 % a los 60 d del corte. El contenido mayor de cenizas y proteína ($p \leq 0.05$) fue 9 y 8 %, y a los 30 d del corte. El poder calorífico no difirió entre frecuencias de corte ($p > 0.05$). Con 180 d de frecuencia de corte se acumuló cantidad mayor ($p \leq 0.05$) de biomasa ($27.95 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), el porcentaje mayor de holocelulosa (73.6 %) y el rendimiento mayor de bioetanol ($281.3 \text{ L Mg materia seca}$). Las características químicas y el rendimiento de biomasa destacan el

ABSTRACT

Evaluation of fast-growing and high biomass-yielding grasses has increased worldwide because they are potential energy crops for the production of second-generation bioethanol. In Mexico, studies on high biomass-producing grasses have begun with the aim of using them for biofuel production. The objective of this study was to evaluate the biomass of *Urochloa brizantha* cv. Toledo as raw material for bioethanol production. Yearly biomass production, calorific power, chemical composition, immediate analysis and theoretical bioethanol yield were determined for six cutting frequencies (30, 60, 90, 120, 150 and 180 d after regrowth). The data were analyzed with GLM (SAS) and treatments means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The highest content of hemicellulose and cellulose ($p \leq 0.05$) was 30.1 and 44.1 % at the frequencies of 60 and 150 d. The lowest content of lignin ($p \leq 0.05$) was 16.2 % at 60 d. The highest contents of ash and protein ($p \leq 0.05$) was 9 and 8 % at 30-d. Calorific power did not differ ($p > 0.05$) between cuttings. With 180 days cutting frequency, the highest quantity ($p \leq 0.05$) of biomass ($27.95 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$), the largest percentage of holocellulose (73.6 %) and the highest yield of bioethanol ($281.3 \text{ L Mg dry matter}$) accumulated. The chemical characteristics and yield of biomass underline the potential of *U. brizantha* for production of bioethanol in tropical areas.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2015. Aprobado: marzo, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 711-726. 2016.

Key words: *Urochloa brizantha*, bioethanol, chemical composition, immediate analysis, calorific power.

potencial de *U. brizantha* para producir bioetanol en áreas tropicales.

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

INTRODUCCIÓN

En décadas recientes se ha investigado fuentes energéticas alternativas que sustituyan paulatinamente a los combustibles fósiles. Ahora, el interés por los biocombustibles, en especial para el sector transporte, se debe a cuatro factores: 1) seguridad en el suministro de energía, 2) disminución de las reservas de hidrocarburos, 3) volatilidad del precio del petróleo, y 4) mitigación de los efectos del cambio climático.

Los biocombustibles de primera generación producidos desde maíz y caña de azúcar impulsaron el aumento de los precios de los alimentos en 2007 y 2008. Esto causó inestabilidad económica y cuestionar la función de los biocombustibles en la crisis alimentaria. Así, los biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica surgieron como alternativa, pues usan como materias primas residuos forestales y agrícolas, como bagazo de caña de azúcar, olote y rastrojo de maíz, paja de trigo y arroz; industriales como pulpa y desechos del procesamiento del papel; residuos sólidos urbanos; y además cultivos de pastos y árboles de crecimiento rápido.

La biomasa lignocelulósica es una matriz densa constituida principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina (Demirbas, 2004). La celulosa es una cadena lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Las hemicelulosas son principalmente cinco azúcares: glucosa, galactosa, manosa, xilosa, y arabinosa. La lignina está integrada por compuestos fenólicos que actúan como inhibidores de la fermentación de los azúcares (Robinson *et al.*, 2002).

En México existe potencial para la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico. Pero, aún existen limitantes técnicas y económicas que impiden la bioconversión eficiente de la biomasa en bioetanol. Los rendimientos de etanol desde biomasa lignocelulósica pueden ser 0.11 a 0.27 m³ Mg-MS⁻¹ (ORNL, 2006).

El etanol se usa como materia prima química o como promotor de octano de gasolinas. Mezclas de etanol:gasolina (v:v) se produjeron en proporciones

INTRODUCTION

In recent decades, different sources of alternative energy have been researched aiming to gradually substitute fossil fuels. Today, interest in biofuels, especially for use in the transportation sector, is due to four factors: 1) safety in supplying energy, 2) decrease in hydrocarbon reserves, 3) volatility in oil prices, and 4) mitigation of the effects of climate change.

First-generation biofuels produced from maize and sugarcane drove food prices up in 2007 and 2008. This caused economic instability and debate over the role of biofuels in the food crisis. Thus, biofuels from lignocellulosic biomass emerged as an alternative using forest and farm residues, such as sugarcane bagasse, maize cobs and stalks, wheat and rice straw; industrial waste such as pulp and paper processing waste; solid urban residues; besides, pasture crops and fast-growing trees.

Lignocellulosic biomass is a dense matrix constituted mainly of cellulose, hemicellulose and lignin (Demirbas, 2004). Cellulose is a linear chain of glucose units linked by $\beta(1\rightarrow4)$ bonds. Hemicelluloses are mainly five sugars: glucose, galactose, mannose, xylose, and arabinose. Lignin is made up of phenolic compounds that act as inhibitors of sugar fermentation (Robinson *et al.*, 2002).

In Mexico, there is potential for the production of bioethanol from lignocellulosic material. However, there are still technical and economic limitations that impede efficient bioconversion of biomass into bioethanol. Ethanol yields from lignocellulosic biomass can be between 0.11 and 0.27 m³ Mg DM⁻¹ (ORNL, 2006).

Ethanol is used as the chemical raw material or as an octane promotor of gasolines. Mixtures of ethanol:gasoline (v:v) were produced in proportions of 8:92 (Hernández-Salas *et al.*, 2009). Bioethanol is combined with 10 % lead-free gasoline (E10) and is used in unmodified internal combustion engines. With the E10 mixture, the maximum permitted amount of ethanol is defined for unmodified motors, because of automobile manufacturer warranties (Yacobucci, 2010). In Mexico, a law on bioenergetics was enacted in 2008. This law fomented the use of bioethanol in domestic gasoline to decrease the use of oxygenating agents such as methyl tertbutyl ether, which is harmful because it

8:92 % (Hernández-Salas *et al.*, 2009). El bioetanol se combina con 10 % de gasolina sin plomo (E10) y se usa en motores de combustión interna sin modificar. Con la mezcla E10 se define la cantidad máxima de etanol permitida para motores no modificados, por las garantías de fabricantes de automóviles (Yacubucci, 2010). En México, la ley de bioenergéticos se aprobó en 2008, y fomenta el uso de bioetanol en la gasolina nacional para reducir el uso de agentes oxigenantes, como éter metil tert-butílico que es dañino por ser un compuesto estable, soluble y contaminante de aguas subterráneas (Nava *et al.*, 2007). Ahora, los biocombustibles se consideran fuente de energía complementaria para suministrar la demanda energética del sector transporte y electricidad.

Algunas gramíneas de crecimiento rápido se han evaluado como materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación. Las tres especies principales son: *Panicum virgatum* (Sarath *et al.*, 2008; Schmer *et al.*, 2008), *Pennisetum purpureum* (Anderson *et al.*, 2008) y *Miscanthus giganteus* (Murnen *et al.*, 2007).

En México las evaluaciones de pastos de rápido crecimiento, se están iniciando para determinar su potencial como fuente de materia prima para la producción de bioetanol. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de *Urochloa brizantha* (Sin. *Brachiaria brizantha*) cv. Toledo, en seis frecuencias de corte, para producir bioetanol en áreas tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

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

is a stable, soluble compound that pollutes ground water (Nava *et al.*, 2007). Currently, biofuels are considered a complementary energy source in the supply of energy for the transportation and electricity sectors.

Some fast-growing grasses were evaluated as raw material for second-generation bioethanol production. The three main species are *Panicum virgatum* (Sarath *et al.*, 2008; Schmer *et al.*, 2008), *Pennisetum purpureum* (Anderson *et al.*, 2008) and *Miscanthus giganteus* (Murnen *et al.*, 2007).

In Mexico, evaluation of fast-growing grasses is initiating in order to determine their potential as sources of raw material for bioethanol production. The objective of this study was to evaluate the potential of *Urochloa brizantha* (Sin. *Brachiaria brizantha*) cv. Toledo at six cutting frequencies for bioethanol production in tropical areas.

MATERIALS AND METHODS

Study area

Biomass yield was evaluated in the Papaloapan Experimental Site of INIFAP (18° 06' N, 95° 31' W and 65 m altitude), in Ciudad Isla, Veracruz, Mexico. Climate is Awo and mean temperature 25.7 °C (García, 1988). Soil is orthic acrisol, sandy loam, pH 4 to 4.7, poor in organic matter, nitrogen, calcium, and potassium, and medium to high contents of phosphorus and magnesium (Enríquez and Romero, 1999). Physical-chemical determinations of forage dry matter (DM) were done in the soil fertility and environmental chemistry laboratory of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. The variables evaluated were biomass yield, extractives, holocellulose, cellulose, lignin, N and calorific power. In addition, immediate analysis was carried out for moisture, fixed carbon, volatile matter and ash.

Plot setup

Grass was sown on July 22, 2011, in rows 0.50 m apart in experimental plots 5 m wide by 15 m long, and replicated three times. The fertilizer formula 120-80-00 kg ha⁻¹ N and P₂O₅ was applied twice, 43 and 112 d after sowing.

Biomass yield (DM ha⁻¹)

Biomass accumulation was determined per unit of area for each cutting frequency: every 30, 60, 90, 120, 150 and 180 d

realizó el análisis inmediato para humedad, carbono fijo, material volátil, cenizas.

Establecimiento de parcelas

La siembra se realizó el 22 de julio de 2011, en surcos con separación de 0.50 m, en parcelas experimentales de 5 m de ancho por 16 m de longitud, con tres repeticiones. Dos fertilizaciones se aplicaron 43 y 112 d después de la siembra, con la fórmula 120-80-00 kg ha⁻¹ de N y P₂O₅.

Rendimiento de biomasa (MS ha⁻¹)

La acumulación de biomasa se determinó por unidad de superficie para cada frecuencia de corte, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 d después del corte de homogeneización (ddch), en muestras destructivas por un año. En cada parcela se lanzó al azar, en cinco ocasiones, un marco cuadrado de metal de (7 m²) y se cortó el forraje total (planta entera), el remanente se dejó a 20 cm de altura para la recuperación de la planta. La biomasa cosechada se pesó en balanza de precisión (Ohaus, Mod. GT-4000; 6.200 kg ±0.1 g). Después, el peso fresco de una submuestra se registró, se deshidrató en una estufa de aire forzado (Felisa, Mod. FE-243A), a 55 °C hasta peso constante y se calculó la MS.

Preparación de las muestras para análisis

Las muestras secadas en la estufa se pulverizaron en un molino (Wiley®; PA, USA) y se tamizaron con mallas No. 40 (0.42-1.00 mm) y No. 60 (0.25-0.42 mm). Luego se realizaron las determinaciones químicas, el análisis inmediato y el poder calorífico.

Composición química

La norma TAPPI T-204 (TAPPI, 2007) se usó para la liberación de extractivos. El contenido de holocelulosa se determinó por el método de cloración ácida (Rowell *et al.*, 2005) y la celulosa con el procedimiento de la norma ASTM D1103 (ASTM, 1977). Las hemicelulosas se obtuvieron después de extraer la celulosa de la holocelulosa. La lignina se determinó de acuerdo con la norma TAPPI T-222 os-74 (TAPPI, 2007) y el contenido de nitrógeno por el método semi-micro Kjeldahl (AOAC-984.13; 1990). Seis determinaciones se realizaron por cada frecuencia de corte en dos repeticiones por muestra.

Análisis inmediato

Para determinar la humedad se utilizó el método de la norma ASTM E871, material volátil según ASTM E872, cenizas según

after the uniformity cut (dauc) in destructive samples per year. On five occasions, a square metal frame (7 m²) was tossed at random into each plot and all of the forage (intact plant) was cut; the remainder was left 20 cm tall for the plant to recover. The harvested biomass was weighed on a precision balance (Ohaus, Mod. GT-4000; 6.200 kg ±0.1 g). The weight of a subsample was recorded. The subsample was then dehydrated in a forced air oven (Felisa, Mod. FE-243A), at 55 °C, until constant weight and DM was calculated.

Sample preparation for analyses

The dried samples were pulverized in a mill (Wiley™; PA, USA) and sifted through No. 40 (0.42-1.00 mm) and No. 60 (0.25-0.42 mm) meshes. After this, chemical determinations, immediate analysis and calorific power calculations were performed.

Chemical composition

TAPPI T-204 (TAPPI, 2007) norm was used for release of the extractives. Holocellulose content was determined by the acid chlorination method (Rowell *et al.*, 2005) and cellulose with the procedure of the ASTM D1103 norm (ASTM, 1977). Hemicelluloses were obtained after extracting the cellulose from holocellulose. The lignin was determined according to the TAPPI T-222 os-74 (TAPPI, 2007) norm, and nitrogen content by the semi-micro Kjeldahl method (AOAC-984.13; 1990). Six determinations were performed for each cutting frequency in two replications per sample.

Immediate analysis

To determine humidity, the method included in the ASTM E871 norm was used; volatile material was determined following ASTM E872 norm, and ash according to ASTM D 1102-84 (ASTM, 2012). Fixed carbon was calculated with the formula $CF=100-(\text{moisture}+\text{ash}+\text{volatile material})$. Three replications were evaluated per sample and nine per cutting frequency.

Calorific power

Calorific power was determined in a calorimeter adiabatic bomb (Isoperibol, Parr 1266), following the standard ASTM (E711), at 30±0.5 °C, with tablets of maximum 1 g. Moisture content was determined in a thermal balance Ohaus MB45™. Five determinations per sample were analyzed and 15 replications per cutting frequency.

ASTM D 1102-84 (ASTM, 2012) y el carbono fijo se calculó con la fórmula: $CF=100-(\text{humedad}+\text{cenizas}+\text{material volátil})$. Tres repeticiones se evaluaron por muestra y nueve por frecuencia de corte.

Poder calorífico

El poder calorífico se determinó en un calorímetro de bomba adiabática (Isoperibol, Parr 1266), de acuerdo con la norma ASTM (E711), a 30 ± 0.5 °C, con pastillas comprimidas de 1 g máximo. El contenido de humedad se determinó en una balanza térmica Ohaus MB45®. Cinco determinaciones por muestra se analizaron y 15 repeticiones por frecuencia de corte.

Rendimiento teórico de bioetanol

El rendimiento teórico de bioetanol se determinó con base a las reacciones de hidrólisis y de transformación de azúcares a etanol, con sus ecuaciones químicas respectivas y estequiometría de reacción de celulosa y hemicelulosas, y las formulas siguientes (Badger, 2002; Dien, 2010):

Para celulosa

$$RTE_C = C * C_{glc} * Ecc * Ret * Efg * Det$$

Para hemicelulosas

$$RTE_H = H * H_{xlb} * Ech * Ret * Efx * Det$$

Total

$$RTE = RTE_C + RTE_H$$

donde RET : L Mg^{-1} MS, C : kg celulosa Mg^{-1} biomasa, H : kg hemicelulosas Mg^{-1} biomasa, C_{glc} : concentración de glucosa (1.111 kg glucosa kg^{-1} celulosa), H_{xlb} : concentración de xilosa (1.136 kg xilosa kg^{-1} hemicelulosas), Ecc : eficiencia de conversión de la celulosa (0.76), Ech : eficiencia de conversión de las hemicelulosas (0.90), Ret : rendimiento estequiométrico de etanol (0.511 kg etanol/kg glucosa; 0.511 kg etanol kg^{-1} xilosa), Efg : eficiencia de fermentación glucosa (0.75), Efx : eficiencia de fermentación xilosa (0.50), Det : densidad de etanol (0.78 $Mg\ m^{-3}$).

Además, la cantidad teórica anual de bioetanol (L) que produce 1 ha de Toledo se calculó para cada frecuencia de corte. El procedimiento consistió en multiplicar el rendimiento teórico de bioetanol por unidad de biomasa, por el rendimiento anual de biomasa.

Theoretical bioethanol yield

Theoretical bioethanol yield was determined based on reactions of hydrolysis and of transformation of sugars into ethanol, with their respective chemical equations and reaction stoichiometry of cellulose and hemicelluloses, and the following formulas (Badger, 2002; Dien, 2010):

For cellulose

$$RTE_C = C * C_{glc} * Ecc * Ret * Efg * Det$$

For hemicelluloses

$$RTE_H = H * H_{xlb} * Ech * Ret * Efx * Det$$

Total

$$RTE = RTE_C + RTE_H$$

where: RET : L Mg^{-1} DM; C : kg cellulose Mg^{-1} biomass, H : kg hemicelluloses Mg^{-1} biomass, C_{glc} : concentration of glucose (1.111 kg glucose kg^{-1} cellulose), H_{xlb} : concentration of xylose (1.136 kg xylose kg^{-1} hemicelluloses), Ecc : efficiency of cellulose conversion (0.76), Ech : efficiency of hemicellulose conversion (0.90), Ret : stoichiometric yield of ethanol (0.511 kg ethanol kg^{-1} glucose; 0.511 kg ethanol kg^{-1} xylose), Efg : efficiency of glucose fermentation (0.75), Efx : efficiency of xylose fermentation (0.50), Det : ethanol density (0.78 $Mg\ m^{-3}$).

Moreover, the theoretical yearly amount of bioethanol (L) that 1 ha of Toledo produces was calculated for each cutting frequency. The procedure consisted of multiplying theoretical yield of bioethanol per unit of biomass by annual biomass yield.

Statistical analysis

The experimental design was randomized blocks with split plots: whole plot was the genotype and subplot was the cutting frequency (30, 60, 90, 120, 150 and 180 d), with three replications. An ANOVA was carried out using the GLM procedure and means were compared with the Tukey test ($p\leq 0.05$). The data were analyzed to estimate the effect of cutting frequency using SAS for Windows version 9 (SAS Institute, 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Biomass yield

Differences ($p\leq 0.05$) were observed in annual biomass yield and cutting frequency. Production

Análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques al azar con arreglo de parcelas divididas: la parcela grande fue el genotipo, y la parcela chica fue la frecuencia de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 d) con tres repeticiones. El ANDEVA se realizó con el procedimiento GLM y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los datos se analizaron para estimar el efecto de frecuencia de corte, y se usó SAS para Windows versión 9 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de biomasa

En el rendimiento de biomasa anual y la frecuencia de corte se observaron diferencias ($p \leq 0.05$). La producción de biomasa aumentó con la frecuencia de corte. La excepción fue el corte cada 150 d, en el cual la cantidad de biomasa disminuyó 21.9 %, con respecto a la frecuencia de corte de 120 d. La producción mayor de biomasa fue 28 Mg ha⁻¹ año⁻¹ con la frecuencia de corte de 180 d (Cuadro 1). Con cortes cada 30 d la producción de biomasa fue menor (11.12 Mg ha⁻¹ año⁻¹). Cab *et al.* (2007) obtuvieron 16.8 Mg ha⁻¹ con pasto Toledo cortado cada 32 d. Switchgrass (*Panicum virgatum*) se estudia con fines energéticos y es materia prima adecuada por los rendimientos altos de biomasa, de 17.3 Mg ha⁻¹ (Parrish and Fike, 2005) a 37.6 Mg ha⁻¹ (Thomason *et al.*, 2004). Los híbridos de *Miscanthus sinensis* también se consideran adecuados para fines energéticos; en las regiones del norte de Europa su rendimiento es 25 Mg ha⁻¹, y en el centro y sur puede ser 38 Mg ha⁻¹ (Lewandowski *et al.*, 2003). El incremento de la proporción de pared celular con la edad del pasto puede ser la causa principal del incremento de MS, y es afectado por factores como disponibilidad de agua, fertilización, desarrollo radical, época del año, plagas y enfermedades.

El rendimiento de biomasa de la variedad Toledo es inferior a los de *Miscanthus* y Switchgrass, pero las condiciones de producción y sitio de crecimiento influyen en el rendimiento de biomasa. Por esto, la información de diferentes estudios es útil, aunque se modifique por el ambiente.

of biomass increased as cutting interval increased. The exception was with cutting every 150 d, with which the amount of biomass decreased 21.9 %, relative to the cutting frequency of 120 d. Production of biomass was 28 Mg ha⁻¹ year⁻¹ with the frequency of 180 d (Table 1). With cutting every 30 d, biomass production was lower (11.12 Mg ha⁻¹ year⁻¹). Cab *et al.* (2007) obtained 16.8 Mg ha⁻¹ with Toledo grass cut every 32 d. Switchgrass (*Panicum virgatum*) is studied with energy goals and is suitable raw material because of its high biomass yields: 17.3 Mg ha⁻¹ (Parrish and Fike, 2005) to 37.6 Mg ha⁻¹ (Thomason *et al.*, 2004). *Miscanthus sinensis* hybrids are also considered suitable for energy production. In northern Europe, it yields 25 Mg ha⁻¹ and, in central and southern Europe, can yield 38 Mg ha⁻¹ (Lewandowski *et al.*, 2003). The increase in the proportion of cell wall with age of the grass may be the main cause of increased DM, and this is affected by factors such as availability of water and fertilization, root development, time of year, pests and diseases.

Biomass yield of the variety Toledo is lower than that of *Miscanthus* and Switchgrass, but production conditions and growing site affect biomass yield. For this reason, the information from different studies is useful even when results are modified by environment.

Calorific power and moisture content

High moisture reduces combustion efficiency because large part of the heat released is used to evaporate water, instead of chemically reducing the material (Hakkila, 1989). Moisture content was different ($p \leq 0.05$) among cutting frequencies (Table 1).

Calorific power per unit of mass is the variable that determines the energy available in the biomass (Godin *et al.*, 2013), and there were no differences among cutting frequencies ($p > 0.05$) (Table 1). Its interval was 16.3 MJ kg⁻¹ to 16.7 MJ kg⁻¹. In our study, calorific power did not exhibit a direct relationship with cutting frequency, the opposite of what is observed in woody species. Firewood, the most used material for generating energy, has a calorific power of approximately 20 MJ kg⁻¹. Values found for Switchgrass are 18.1 MJ kg⁻¹ (Jenkins *et*

Cuadro 1. Rendimiento de biomasa y producción teórica de bioetanol del pasto *Urochloa brizantha* cv. Toledo en seis frecuencias de cosecha.**Table 1. Biomass yield and theoretical production of bioethanol from *Urochloa brizantha* cv. Toledo grass at six harvest frequencies.**

Frecuencias de cosecha (días)	Rendimiento (Mg ha ⁻¹ año ⁻¹)	Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)	Producción de energía (GJ ha ⁻¹ año ⁻¹)	Humedad (%)
30	11.1 ^f	16.37 ^a	182.2 ^f	8.40 ^c
60	13.7 ^e	16.33 ^a	224.2 ^e	7.40 ^c
90	18.4 ^c	16.64 ^a	307.2 ^c	8.20 ^a
120	20.7 ^b	16.37 ^a	340.1 ^b	7.90 ^c
150	16.2 ^{d*}	16.72 ^a	271.5 ^d	6.80 ^{bc}
180	28.0 ^a	16.69 ^a	466.6 ^a	7.70 ^{ab}
Media	18.40	16.52	298.7	7.79
EE	2.40	0.07	40.70	0.19

EE: Error estándar. Letras diferentes muestran diferencias entre cortes (Tukey, $p \leq 0.05$). *Dos cortes a los 150 d ♦ EE: Standard error. Different letters indicate differences between cuttings (Tukey, $p \leq 0.05$). *Two cuttings 150 d apart.

Poder calorífico y contenido de humedad

La humedad alta reduce la eficiencia de la combustión porque gran parte del calor liberado se usa para evaporar el agua en lugar de la reducción química del material (Hakkila, 1989). El contenido de humedad fue diferente ($p \leq 0.05$) entre las frecuencias de corte (Cuadro 1).

El poder calorífico por unidad de masa es la variable que determina la energía disponible en la biomasa (Godin *et al.*, 2013) y no mostró diferencias entre las frecuencias de corte ($p > 0.05$) (Cuadro 1); su intervalo fue de 16.3 MJ kg⁻¹ a 16.7 MJ kg⁻¹. En nuestro estudio, el poder calorífico no mostró relación directa con la frecuencia de corte, opuesto a lo observado en especies leñosas. La leña es la más usada para generar energía y su poder calorífico aproximado es 20 MJ kg⁻¹. Los valores de Switchgrass son 18.1 MJ kg⁻¹ (Jenkins *et al.*, 1998) y 17.4 MJ kg⁻¹ (McKendry, 2002). El valor de maderas de coníferas es 20.5 MJ kg⁻¹ y el de maderas de latifoliadas es 20.2 MJ kg⁻¹ (CEN, 2005). El poder calorífico promedio de Toledo es de 16.52 MJ kg⁻¹, lo que es inferior al de maderas y otros pastos.

La producción anual mayor de energía (466.56 Gigajulios; GJ) por hectárea con pasto Toledo se logra con la cosecha cada 180 d (dos cortes anuales) (Cuadro 1). Los rendimientos anuales con eucalipto (*Eucalyptus* spp.) en Brasil (24 Mg ha⁻¹) y la energía anual por hectárea (448.52 GJ) (Roger *et al.*, 2011) fueron menores a los obtenidos con pasto Toledo.

al., 1998) and 17.4 MJ kg⁻¹ (McKendry, 2002). The value of pinewoods is 20.5 MJ kg⁻¹ and that of wood from broadleaf trees is 20.2 MJ kg⁻¹ (CEN, 2005). The average calorific power of Toledo is 16.52 MJ kg⁻¹, making it inferior to wood and other grasses.

The highest annual production of energy (466.56 gigajoules; GJ) per hectare of Toledo grass was achieved by harvesting every 180 d (two cuts per year) (Table 1). Annual yields with eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) in Brazil (24 Mg ha⁻¹) and annual energy per hectare (448.52 GJ) (Roger *et al.*, 2011) were lower than those obtained with Toledo grass.

Chemical composition

Total extractives

Chemical composition enables definition of pre-treatment, hydrolysis and fermentation methodology. The extractives function as metabolic intermediaries, energy reserves, or form part of mechanisms of protection; they are responsible for color, odor and resistance to plant wilting (Olanders and Steenari, 1995). Differences ($p \leq 0.05$) in frequencies of these components were observed (7.7 to 11.8 % in 90 and 180 d). Frequency in Maralfalfa (*Pennisetum glaucum* × *Pennisetum purpureum*), Bermuda (*Cynodon dactylon*) and King (*Pennisetum hybrids*) grass was 10.7, 5.5 and 16.9 % (Lee *et al.*, 2009; Mateus *et al.*, 2012; Cardona, 2013; Table 2). Rowell *et al.* (2005) report 8 and 9 % in pinewoods and

Composición química

Total de extractivos

La composición química permite definir la metodología para pretratamiento, hidrólisis y fermentación. Los extractivos funcionan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o forman parte de mecanismos de protección, son responsables del color, olor y resistencia al marchitamiento de las plantas (Olanders y Steenari, 1995). En las frecuencias de estos componentes se observaron diferencias ($p \leq 0.05$) (7.7 a 11.8 % en 90 y 180 d). La frecuencia en los pastos Maralfalfa (*Pennisetum glaucum* × *Pennisetum purpureum*), Bermuda (*Cynodon dactylon*) y King (*Pennisetum híbrido*) fue 10.7, 5.5 y 16.9 % (Lee *et al.*, 2009; Mateus *et al.*, 2012; Cardona, 2013; Cuadro 2). Rowell *et al.* (2005) reportan 8 y 9 % en madera de coníferas y latifoliadas. La cantidad de extractivos depende de la fisiología y la morfología de la planta y las condiciones ambientales. Los extractivos no pueden ser transformados a etanol, por lo que la biomasa lignocelulósica con cantidad mayor de extractivos causará rendimiento menor de etanol.

Holocelulosa

La combinación de celulosa y hemicelulosas constituye la holocelulosa y 60 a 80 % de la biomasa lignocelulósica en una célula podría ser fuente de energía. En teoría, un contenido elevado de carbohidratos corresponderá con cantidades mayores de

broadleaf wood. The quantity of extractives depends on the physiology and morphology of the plant and environmental conditions. Extractives cannot be transformed into ethanol, and so the lignocellulose biomass with higher quantity of extractives will cause lower ethanol yield.

Holocellulose

The combination of cellulose and hemicelluloses makes up holocellulose. Between 60 and 80 % of the lignocellulosic biomass in a cell could be an energy source. Theoretically, a high content of carbohydrates means larger amounts of bioethanol. The quantity of holocellulose was different ($p \leq 0.05$) among cutting frequencies (Table 2) and the interval of values was 68.5 to 73.6 % (90 and 180 d). The lowest quantities were obtained with the frequencies of 30, 60 and 90 d. The quantity of holocellulose increased with the interval between cuttings up to a high of 73.6 % with the frequency of 180 days. At this cutting interval, the highest quantity of sugars for production of bioethanol was detected.

Holocellulose values for other C4 grass species are the following: 56.3 % Maralfalfa, 53.5 and 76.4 % Switchgrass, 59.7 % Bermuda and 76.5 % *Miscanthus* spp. (Sun and Cheng, 2002; Lee *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Brosse *et al.*, 2012; Mateus *et al.*, 2012). The highest quantity of holocellulose in Toledo grass was 73.6 %, which was lower than *Miscanthus*, similar to Switchgrass and higher than

Cuadro 2. Composición química del pasto *Urochloa brizantha* cv. Toledo en seis frecuencias de cosecha.

Table 2. Chemical composition of *Urochloa brizantha* cv. Toledo grass at six harvesting frequencies.

Frecuencia de cosecha (días)	Componente (%)					
	Holocelulosa [†]	Celulosa [†]	Hemicelulosas [†]	Lignina [†]	Extractivos	Proteína
30	69.5 ^{cd}	39.4 ^d	30.1 ^a	16.8 ^c	10.1 ^{bc}	8.2 ^a
60	71.3 ^{cd}	41.3 ^c	30.0 ^a	16.2 ^c	10.8 ^{abc}	4.8 ^b
90	68.5 ^d	41.7 ^c	26.7 ^c	19.5 ^a	7.7 ^d	4.3 ^{bc}
120	71.5 ^b	42.6 ^{bc}	28.9 ^{ab}	16.8 ^c	9.4 ^c	4.3 ^{bc}
150	72.7 ^{ab}	44.1 ^a	28.5 ^b	17.1 ^{bc}	11.5 ^{ab}	2.4 ^c
180	73.6 ^a	43.7 ^{ab}	29.9 ^{ab}	18.3 ^{ab}	11.8 ^a	2.8 ^c
Media	71.1	42.1	29.0	17.4	10.2	4.5
EE	0.78	0.70	0.53	0.49	0.61	0.83

EE: Error estándar. Letras diferentes muestran diferencias entre cortes (Tukey, $p \leq 0.05$). [†] Valores con base al peso libre de humedad y de extractivos ❖ EE: Standard error. Different letters indicate differences between cuttings (Tukey, $p \leq 0.05$). [†] Values based on moisture- and extractive-free weight.

bioetanol. La cantidad de holocelulosa mostró diferencias ($p \leq 0.05$) entre las frecuencias de corte (Cuadro 2) y el intervalo de valores fue 68.5 a 73.6 % (90 y 180 ddch). Las cantidades menores se obtuvieron con las frecuencias de 30, 60 y 90 d. La cantidad de holocelulosa aumentó con la frecuencia de corte hasta un máximo de 73.6 % a 180 d, en el que se detectó cantidad mayor de azúcares para obtener bioetanol.

Los valores de holocelulosa en otras especies de pasto C4, son: 56.3 % en Maralfalfa, 53.5 y 76.4 % en Switchgrass, 59.7 % en Bermuda y 76.5 % en *Miscanthus* spp. (Sun y Cheng, 2002; Lee *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Brosse *et al.*, 2012; Mateus *et al.*, 2012). La cantidad mayor de holocelulosa en pasto Toledo fue 73.6 % e inferior al de *Miscanthus*, similar a de *Switchgrass* y superior a de Maralfalfa y Bermuda. La composición y porcentaje de los polímeros varía entre especies, etapa de crecimiento y edad de la planta.

Celulosa

La hidrólisis de celulosa por enzimas celulolíticas o química con ácido sulfúrico u otros ácidos produce glucosa (Sues *et al.*, 2005), que es la fuente principal para la fermentación. El contenido de celulosa fue diferente ($p \leq 0.05$) entre frecuencias de corte. El porcentaje menor y mayor correspondió a 30 (39.4%) y 150 d (44.1 %) (Cuadro 2). El aumento de celulosa con la edad del pasto se debe al engrosamiento de la pared secundaria. El contenido de celulosa de Switchgrass es 31 a 45 % (Sun y Cheng, 2002; Carroll y Somerville, 2009). Los pastos contienen 25 a 40 % de celulosa (Sun y Cheng, 2002), las maderas de las latifoliadas 40 a 55 % y de las coníferas 45 a 50 % (Betts *et al.*, 1991). El contenido de celulosa en pasto Toledo fue menor que el de las maderas y superiores al de los pastos Switchgrass, *Miscanthus* y Maralfalfa.

Hemicelulosas

Las hemicelulosas también son fuente de carbohidratos en la biomasa lignocelulósica, están constituidas por cadenas ramificadas de pentosas y hexosas, con potencial para ser hidrolizadas a azúcares, como xilosa, arabinosa, galactosa, glucosa y manosa. El contenido de las hemicelulosas fue diferente ($p \leq 0.05$) entre las frecuencias de corte. Los

Maralfalfa and Bermuda. The composition and percentage of polymers vary among plant species, growth stage and age.

Cellulose

Cellulose hydrolysis by cellulolytic enzymes or chemically with sulfuric acid or other acids produces glucose (Sues *et al.*, 2005) and constitutes the main source of available glucose for fermentation. The content of cellulose was different ($p \leq 0.05$) among cutting frequencies. The lowest and the highest percentage corresponded to every 30 (39.4 %) and 150 days (44.1 %) (Table 2). The increase in cellulose with age of the grass is due to thickening of the secondary cell wall. The contents of cellulose in Switchgrass is 31 to 45 % (Sun and Cheng, 2002; Carroll and Somerville, 2009). Grasses contain between 25 and 40 % cellulose (Sun and Cheng, 2002), while broadleaf woods contain 40 to 44 % and conifers 45 to 50 % (Betts *et al.*, 1991). The cellulose content of Toledo grass was lower than that of wood and higher than that of Switchgrass, *Miscanthus* and Maralfalfa.

Hemicelluloses

Hemicelluloses are also sources of carbohydrates in the lignocellulosic biomass. They are ramified pentose and hexose chains, which can potentially be hydrolyzed to sugars, such as xylose, arabinose, galactose, glucose and mannose. The hemicellulose contents were different ($p \leq 0.05$) among cutting frequencies. The lowest contents (26.7 and 28.5 %) were obtained with the frequencies of 90 and 150 days (Table 2). The highest proportion (30 %) was with frequencies of 30 and 60 d.

The average hemicellulose contents of the frequencies was 29 %. Sun and Cheng (2002) report 31.4 % hemicellulose in Switchgrass and 35.7 % in Bermuda. Brosse (2012) obtained 30.3 % in *Miscanthus* spp. and in Maralfalfa 22.54 % (Mateus *et al.*, 2012). In Toledo grass, the content was similar to that in Switchgrass and *Miscanthus*, lower than in Bermuda and higher than in Maralfalfa. Hemicellulose contents are homogeneous among grasses. Nevertheless, characterization of the sugars in each species is necessary to identify the enzymes suitable for

contenidos menores (26.7 y 28.5 %) se obtuvieron con las frecuencias de corte de 90 y 150 d (Cuadro 2); la proporción mayor (30 %) fue con las frecuencias de 30 y 60 d.

El promedio de las hemicelulosas de las frecuencias fue 29 %. Sun y Cheng (2002) reportan 31.4 % de hemicelulosas en Switchgrass y 35.7 % en Bermuda; Brosse (2012) obtuvo 30.3 % en *Miscanthus* spp. y en Maralfalfa 22.54 % (Mateus *et al.*, 2012). El contenido del pasto Toledo fue similar al de Switchgrass y *Miscanthus*, inferior al de Bermuda y superior a Maralfalfa. Los contenidos de hemicelulosas son homogéneos entre pastos. No obstante, la caracterización de los azúcares en cada especie es necesaria para identificar las enzimas adecuadas que aumenten la eficiencia del proceso de fermentación y el rendimiento de bioetanol.

Lignina

Las diferencias en el contenido de lignina entre las frecuencias de corte fueron significativas ($p \leq 0.05$) (Cuadro 3). Los valores entre 16.2 a 18.3 % presentaron sólo 2.1 % de variabilidad. Esto indica que la lignificación es notablemente homogénea entre edades de cosecha. El contenido de lignina en Switchgrass, Bermuda y *Miscanthus* es 15 y 28 % (Lee *et al.*, 2009; Hodgson *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012), en Maralfalfa (*Pennisetum glaucum* × *Pennisetum purpureum*) es 22.54 %. En madera de coníferas es 27 a 30 % y en madera de latifoliadas 20 a 25 % (McKendry, 2002). La cantidad de lignina en pasto Toledo es menor a la presente en Switchgrass, Bermuda, Maralfalfa y maderas, y similar a *Miscanthus*. La lignina no es fermentada a etanol y su presencia es negativa para la fermentación. Por lo tanto, en el proceso viable para obtener etanol, a partir de lignocelulosa, debe extraerse y puede aprovecharse para obtener otros productos.

Proteína

La cantidad de proteína fue diferente ($p \leq 0.05$) entre las frecuencias de corte y al madurar la planta el contenido fue menor. La cantidad mayor (8.2 %) correspondió al corte de 30 d (Cuadro 2). Rincón *et al.* (2008) reportan 11.2 % de proteína cruda en el pasto Toledo 28 d después del rebrote; ese valor fue mayor al de nuestro estudio. Chacón-Hernández y Vargas-Rodríguez (2009) indican 9.5,

increasing the efficiency of the fermentation process and bioethanol yield.

Lignin

The differences in lignin content among cutting frequencies were significant ($p \leq 0.05$) (Table 3). The values between 16.2 and 18.3 % had a variability of only 2.1 %, indicating that lignification is notably homogeneous among harvesting ages. The content of lignin in Switchgrass, Bermuda and *Miscanthus* is 15 and 28 % (Lee *et al.*, 2009; Hodgson *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012), while in Maralfalfa (*Pennisetum glaucum* × *Pennisetum purpureum*) it is 22.54 %. McKendry (2002) found 27 to 30 % in pinewoods and 20 to 25 % in broadleaf woods. The quantity of lignin in Toledo grass is lower than that in Switchgrass, Bermuda, Maralfalfa and woods, and is similar to that in *Miscanthus*. Lignin does not ferment to ethanol and its presence negatively affects fermentation. Therefore, a viable process for obtaining ethanol from lignocellulose should extract the lignin and use it for other products.

Protein

The amount of protein was different ($p \leq 0.05$) among cutting frequencies; as the plant matured, the content decreased. The highest content (8.2 %) was found in grass cut every 30 d (Table 2). Rincón *et al.* (2008) report 11.2 % crude protein in Toledo grass 28 d after regrowth. This value was higher than those of our study. Chacón-Hernández and Vargas-Rodríguez (2009) show 9.5, 8.7 and 8.4 % crude protein in King grass (*Pennisetum purpureum*) cut at: 60, 75 and 90 d. The three values were higher than those of Toledo grass in our study. The more protein in the biomass, the lower the bioconversion of total sugars into bioethanol because the proteins of the cell wall form bridges with ferulic acid and increase resistance and insolubility of the entire structure (Bidlack *et al.*, 1992).

Immediate analysis

Immediate analysis indicates the chemical energy stored in the biomass in the form of volatile matter and fixed carbon. The analysis consists of separating

Cuadro 3. Análisis inmediato del pasto *Urochloa brizantha* cv. Toledo en seis frecuencias de cosecha.
Table 3. Immediate analysis of *Urochloa brizantha* cv. Toledo grass at six harvesting frequencies.

Frecuencia de cosecha (días)	Componente (%)			
	Humedad	Cenizas	Carbono fijo	Materia volátil
30	8.4 ^a	9.0 ^a	17.2 ^{ab}	73.6 ^d
60	7.9 ^a	8.1 ^b	16.6 ^{ab}	75.1 ^c
90	8.1 ^a	8.1 ^b	17.8 ^a	73.9 ^{cd}
120	8.1 ^a	6.4 ^c	16.8 ^{ab}	76.7 ^b
150	7.1 ^b	5.2 ^d	16.3 ^b	78.4 ^a
180	7.8 ^a	5.3 ^d	16.3 ^b	78.2 ^a
Media	7.9	7.0	16.8	75.9
EE	0.18	0.65	0.23	0.85

EE: Error estándar. Letras diferentes muestran diferencias entre cortes (Tukey, $p \leq 0.05$) ♦ EE: Standard error. Different letters indicate differences between cuttings (Tukey, $p \leq 0.05$).

8.7 y 8.4 % de proteína cruda de en pasto King (*Pennisetum purpureum*) cortado a 60, 75 y 90 d, valores superiores a los del pasto Toledo de nuestro estudio. A mayor cantidad de proteína en la biomasa menor será la bioconversión de azúcares totales a bioetanol porque las proteínas de la pared celular forman puentes con el ácido ferúlico y aumentan la resistencia e insolubilidad de toda la estructura (Bidlack *et al.*, 1992).

Análisis inmediato

El análisis inmediato indica la energía química almacenada en la biomasa en forma de materia volátil y carbono fijo. El análisis consiste en la separación de compuestos del combustible dependiente de su volatilidad, al calentarlo gradualmente, y proporciona los contenidos de humedad, cenizas, materia volátil y carbono fijo.

Humedad

La mayoría de los procesos de conversión energética requiere que la biomasa tenga humedad inferior a 30 % (Valverde *et al.*, 2007). En pasto Toledo la humedad fue 7.1 y 8.4 % (Cuadro 3). El valor a los 150 d (7.1 %) mostró diferencia ($p \leq 0.05$) entre las frecuencias de corte. Humedad de 11.5, 13 y 15, 20 y 6 % se ha documentado en *Miscanthus*, *Switchgrass*, madera y paja (McKendry, 2002). La humedad facilita la formación de hidrógeno, pero reduce la eficiencia térmica.

the compounds of the fuel depending on their volatility by gradual heating and it provides the contents of moisture, ash, volatile matter and fixed carbon.

Moisture

Most processes of energy conversion require that the biomass contain moisture below 30 % (Valverde *et al.*, 2007). In Toledo grass, moisture accounts for 7.1 to 8.4 % (Table 3). The value at 150 d (87.1 %) was different ($p \leq 0.05$) among cutting frequencies. Moisture of 11.5, 13 and 15, 20 and 6 % has been documented for *Miscanthus*, *Switchgrass*, wood and straw (McKendry, 2002). Moisture facilitates the formation of hydrogen but reduces thermal efficiency.

Ash

Ash content decreased with grass maturity and changed ($p \leq 0.05$) between cutting frequencies (Table 3). The highest content (9 %) corresponded to the frequency of 30 d and the lowest contents (5.2 and 5.3 %) to that of 150 and 180 d. The values determined in other grasses are similar to those of our study: 3.8 % *Switchgrass*, 4.8 % *Bermuda* and 2.5 % *Maralfalfa* (Lee *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Mateus *et al.*, 2012). These values contrast with those obtained by Chacón-Hernández and Vargas-Rodríguez (2009) in King grass (*Pennisetum purpureum*), at 60, 75 and 90 d after regrowth (14.5, 13.8 and 13.6 %).

Cenizas

El contenido de cenizas disminuyó con la madurez del pasto y cambió ($p \leq 0.05$) entre frecuencias de corte (Cuadro 3). El contenido máximo (9 %) correspondió a la frecuencia de 30 d y los mínimos (5.2 y 5.3 %) a 150 y 180 d. Los valores determinados en otros pastos son similares a los de nuestro estudio: 3.8 % en Switchgrass, 4.8 % en Bermuda y 2.5 % en Maralfalfa (Lee *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Mateus *et al.*, 2012). Estos valores contrastan con los obtenidos por Chacón-Hernández y Vargas-Rodríguez (2009) en pasto King (*Pennisetum purpureum*) a los 60, 75 y 90 d de rebrote (14.5, 13.8 y 13.6 %).

El contenido de cenizas difiere entre especies, no tiene valor energético y es mayor en residuos agrícolas. Las plantas herbáceas contienen más cenizas y sílice que las maderas. En el proceso de combustión, el conocimiento de la concentración de las cenizas es necesario para mejorar la eficiencia de la operación y reducir los costos asociados con la producción de escoria en las calderas o calentadores. Como alternativa, las cenizas se pueden usar para remediar suelos ácidos porque son completamente inocuas.

Materia volátil

Al inicio de la combustión se desprenden CO, CO₂, H₂ y otros gases derivados de los compuestos volátiles mediante un proceso exotérmico que ayuda a la combustión (Lewandowski y Kicherer, 1997). La cantidad de materia volátil mostró diferencia ($p \leq 0.05$) entre las frecuencias de corte; los porcentajes mayores (78.4 y 78.2 %) fueron para los 150 d 180 d, y los menores (73.6 %) a los 30 d (Cuadro 3). La cantidad de material volátil en *Miscanthus* fue 66.8 %, en paja de cereales 79 %, en residuos forestales 79.8 %, en Switchgrass 76.6 % y en bagazo de caña 83.6 % (McKendry, 2002; Vamvuka *et al.*, 2003; Yin, 2011). El contenido de materia volátil en pasto Toledo fue similar al reportado en Switchgrass, paja de cereales y residuos forestales; fue mayor que en *Miscanthus* y menor que en bagazo de caña. El contenido de compuestos volátiles indica reactividad, facilidad de ignición y velocidad de combustión de la biomasa.

Ash content differs among species, has no energy value and is higher in farm residues. Herbaceous plants have higher ash and silica contents than woods. In the process of combustion, it is necessary to know the ash concentration to improve efficiency of the operation and reduce costs associated with production of waste in the boilers or heaters. Alternatively, the ashes can be used to remedy acid soils since they are completely harmless.

Volatile matter

During initial combustion, CO, CO₂, H₂ and other gases derived from volatile compounds are released through an exothermic process that aids combustion (Lewandowski and Kicherer, 1997). Amounts of volatile matter were different ($p \leq 0.05$) among cutting frequencies. The highest percentages (78.4 and 78.2 %) were found for frequencies of 150 and 180 d; the lowest (73.6 %) were for to the 30 d frequency (Table 3). The amount of volatile matter in *Miscanthus* was 66.8 %, in cereal straws 79 %, in forest residues 79.8 %, in Switchgrass 76.6 %, and in sugarcane bagasse 83.6 % (McKendry, 2002; Vamvuka *et al.*, 2003; Yin, 2011). The content of volatile matter in Toledo grass was similar to that reported for Switchgrass, cereal straw and forest residues; it was higher than in *Miscanthus* and lower than in sugarcane bagasse. Volatile matter content indicates reactivity, ease of ignition and rate of combustion of the biomass.

Fixed carbon

Fixed carbon is the residual mass after release of volatile compounds, excluding ash and moisture. It is indicative of partially burned combustible material in the ashes. The amount of fixed carbon among the cutting frequencies was different ($p \leq 0.05$) (Table 3). Fixed carbon accounted for 16.3 to 17.8 % and cutting frequencies of 150 and 180 days had lower quantities (16.3 %). McKendry (2002) quantified 15.9 and 21 % fixed carbon in *Miscanthus* and wheat straw, and Vamvuka *et al.* (2003) found 20 % in forest residues. The percentage of fixed carbon in Toledo grass was lower than that of wheat straw and forest residues and similar to that of *Miscanthus*. Fixed carbon is

Carbono fijo

El carbono fijo es la masa residual de la liberación de compuestos volátiles, excluyendo ceniza y humedad y es indicativo del material combustible parcialmente quemado en las cenizas. La cantidad de carbono fijo entre las frecuencias de corte mostró diferencia ($p \leq 0.05$) (Cuadro 3). El carbono fijo comprendió de 16.3 a 17.8 % y los cortes a 150 y 180 d tuvieron cantidad menor (16.3 %). McKendry (2002) reportó 15.9 y 21 % de carbono fijo en *Miscanthus* y paja de trigo, y Vamvuka *et al.* (2003) 20 % en residuos forestales. El porcentaje de carbono fijo en el pasto Toledo fue inferior al de paja de trigo y de residuos forestales y similar al de *Miscanthus*. El carbono fijo tiene relación directa con la masa de lignina por su notable resistencia a la descomposición térmica. Cantidades mayores de carbono fijo causan rendimientos menores de bioetanol.

Rendimiento teórico a bioetanol

De acuerdo con las reacciones químicas, el rendimiento máximo teórico de bioetanol es 0.51 kg y 0.49 kg de dióxido de carbono por kg de glucosa o xilosa (Balat *et al.*, 2008). Con base en cálculos estequiométricos, la hidrólisis de la celulosa y las hemicelulosas a azúcares fermentables es 76 y 90 % y la eficiencia de conversión de glucosa a etanol es 75 % y de xilosa a etanol es 50 % (Badger, 2002).

Los contenidos de celulosa y hemicelulosas determinan el rendimiento teórico de bioetanol por unidad de biomasa. Los rendimientos mayores de bioetanol por unidad de biomasa fueron 281.3 y 278.6 L Mg MS⁻¹, a los 150 y 180 d. El intervalo estimado fue de 262.6 a 281.3 L Mg MS⁻¹ (Cuadro 4). El rendimiento anual de bioetanol se relaciona directamente con la producción de biomasa cosechada. El rendimiento máximo anual de bioetanol (7865.1 L Mg⁻¹ año⁻¹) fue a los 180 d y diferente ($p \leq 0.05$) a los demás cortes. El corte a los 30 d generó la producción menor (2935.6 L Mg⁻¹ año⁻¹).

El rendimiento de bioetanol entre las frecuencias de corte mostró la inconveniencia de los cortes en etapas tempranas del cultivo porque el rendimiento anual de biomasa y de bioetanol es bajo. Además, el costo de cosecha aumenta al realizar número mayor de cortes por año.

directly related to the mass of lignin because it is notably resistant to thermic decomposition. Higher quantities of fixed carbon cause lower bioethanol yields.

Theoretical bioethanol yield

Based on chemical reactions, the maximum theoretical yield of bioethanol is 0.51 kg and 0.49 kg carbon dioxide per kg of glucose or xylose (Balat *et al.*, 2008). Stoichiometric calculations have determined that hydrolysis of cellulose and hemicelluloses to fermentable sugars is 76 and 90 %, and conversion efficiency of glucose to ethanol is 75 %, while that of xylose to ethanol is 50 % (Badger, 2002).

Cellulose and hemicellulose contents determine theoretical bioethanol yield per unit of biomass. The highest bioethanol yields per unit of biomass were 281.3 and 278.6 L Mg DM⁻¹, for the 150- and 180-day frequencies. The estimated interval was between 262.6 and 281.3 L Mg DM⁻¹ (Table 4). Annual bioethanol yield is directly related to harvested biomass. The maximum annual yield of bioethanol (7865.1 L Mg⁻¹ year⁻¹) was at 180 d and different ($p \leq 0.05$) from the other cutting frequencies. Cutting every 30 d resulted in lowest production (2935.6 L Mg⁻¹ year⁻¹).

Differences in bioethanol yield among cutting frequencies evidenced the inconvenience of harvesting at early stages of the crop since the annual yield of biomass and of bioethanol is low. Moreover, the cost of harvesting increases when cutting is more frequent during the year.

McKendry (2002) indicate that by enzyme hydrolysis up to 280 L Mg DM⁻¹ ethanol can be obtained from Switchgrass and 205 L Mg DM⁻¹ from wood. Bioethanol yield from Toledo grass (Table 5) is between these values and those obtained with maize stalks (Sendich *et al.*, 2008). In contrast, yields above 340 L Mg DM⁻¹ are reported for *Miscanthus* (Godin *et al.*, 2013) and Switchgrass (Laser *et al.*, 2009). The difference in theoretical bioethanol yield is due mainly to the efficiency values used in the calculations, mainly in hydrolysis and fermentation (Spatari *et al.*, 2010), and in dry biomass yields and cellulose and hemicellulose contents (Godin *et al.*, 2013).

McKendry (2002) indica que mediante hidrólisis enzimática se obtienen hasta 280 L Mg-MS⁻¹ de etanol desde *Switchgrass* y 205 L Mg-MS⁻¹ desde madera. El rendimiento de bioetanol de pasto Toledo (Cuadro 5) está entre estos valores y el obtenido con rastrojo de maíz (Sendich *et al.*, 2008). En contraste, hay rendimientos mayores a 340 L Mg MS⁻¹ para *Miscanthus* (Godin *et al.*, 2013) y *Switchgrass* (Laser *et al.*, 2009). La diferencia en el rendimiento teórico de bioetanol se debe principalmente a los valores de eficiencia usados para los cálculos, principalmente en la hidrólisis y en la fermentación (Spartari *et al.*, 2010), y los rendimientos de biomasa seca y contenidos de celulosa y hemicelulosas (Godin *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

El rendimiento de *U. brizantha* cv. Toledo aumenta con el intervalo entre cortes. La composición química también se modifica, pues carbohidratos totales (holocelulosa) y lignina aumentan con los días a la cosecha y, en consecuencia, el rendimiento teórico de bioetanol aumenta con el período de cosecha. Los valores máximos de materia seca, carbohidratos tota-

Cuadro 4. Rendimiento teórico de bioetanol del pasto *Urochloa brizantha* cv. Toledo en seis frecuencias de cosecha.

Table 4. Theoretical yield of bioethanol from *Urochloa brizantha* cv. Toledo grass at six harvest frequencies.

Frecuencia de cosecha (Días)	Producción de bioetanol	
	L Mg-MS ⁻¹	L ha ⁻¹ año ⁻¹
30	264.3 ^{cd}	2935.6 ^e
60	271.6 ^{bc}	3720.0 ^{de}
90	262.6 ^d	4858.3 ^{bc}
120	273.1 ^b	5677.0 ^b
150	278.6 ^{ab}	4517.8 ^{cd}
180	281.3 ^a	7865.1 ^a
Media	271.9	4928.9
EE	3.04	702.1

EE: Error estándar. Letras diferentes muestran diferencias entre cortes (Tukey, $p \leq 0.05$) ♦ EE: Standard error. Different letters indicate differences between cuttings (Tukey, $p \leq 0.05$).

CONCLUSIONS

Yield of *U. brizantha* cv. Toledo increases with the length of the interval between cuttings. Chemical composition also changes: total carbohydrates (holocellulose) and lignin increase with days to harvest and, consequently, the theoretical bioethanol yield increases as harvest frequency decreases. The highest values of dry matter, total carbohydrates and bioethanol were obtained with harvests at intervals of 180 days.

The results for dry matter yield and chemical characteristics of the biomass indicate that *U. brizantha* cv. Toledo is an option for production of bioethanol.

—End of the English version—



les y bioetanol se obtienen con la cosecha en intervalos de 180 días.

Los resultados del rendimiento de materia seca y las características químicas de la biomasa indican que

Cuadro 5. Rendimiento teórico de bioetanol del pasto *Urochloa brizantha* cv. Toledo y otras fuentes de biomasa.

Table 5. Theoretical yield of bioethanol from *Urochloa brizantha* cv. Toledo grass and other sources of biomass.

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

U. brizantha cv. Toledo es una opción para la producción de bioetanol.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial SENER-CONACYT- Sustentabilidad Energética, a través del proyecto 151370, por el financiamiento para realizar los análisis de composición química (con excepción del contenido de proteína), inmediato y de poder calorífico.

LITERATURA CITADA

- Anderson, W., B. Dien, S. Brandon, and J. Peterson. 2008. Assessment of bermudagrass and bunch grasses as feedstock for conversion to ethanol. *App. Biochem. Biotech.* 145: 13-21.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Protein (Crude) Determination in Animal Feed. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Helrich, K. (ed). AOAC. Arlington, VA, U.S.A. pp: 72-74.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1977. Method of Test for Alpha-Cellulose in Wood ASTM D1103-60. *Annual Book of ASTM Standards*. Part 22: Wood; Adhesives. ASTM, Easton, Md., USA. pp: 346-348.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2012. *Annual Book of ASTM Standards*. Vol. 11.06. Biological effects and environmental fate; biotechnology. ASTM International, West Cornshohocken, PA, USA. 1461 p.
- Badger, P. C. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. *In: Janick, J. and A. Whipkey* (eds). *Trends in New Crops and New Uses*, Vol. 1. ASHS Press, Alexandria, VA. pp: 17-21.
- Balat, M., H. Balat, and S. Oz. 2008. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energ. Combust. Sci.* 34: 551-573.
- Betts, W. B., R. K. Dart, A. S. Ball, and S. L. Pedlar. 1991. Biosynthesis and Structure of lignocellulose. *In: Betts, W. B.* (ed). *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp: 139-155.
- Bidlack, J., M. Malone, and R. Benson. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. the Okla. Acad. Sci.* 71: 51-56.
- Brosse, N., A. Dufour, X. Meng, Q. Sun, and A. Ragauskas. 2012. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels. Bioprod. Bioref.* 6: 580-598.
- Cab, F. E. J., J. F. Enríquez Q., J. Pérez P., A. Hernández G., J. G. Herrera H., E. Ortega J. y A. R. Quero C. 2007. Potencial productivo de tres especies de *Brachiaria* en monocultivo y asociadas con *Arachis pintoi* en Isla, Veracruz. *Técnica Pecuaria* 46: 317-332.
- Cardona M. E., L. A. Rios, y J. D. Peña. 2012. Disponibilidad de variedades de pastos y forrajes como potenciales materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol en Colombia. *Información Tecnológica* 23: 87-96.
- Carroll, A., and C. Somerville. 2009. Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology* 60: 165-182.
- CEN (Comité Européen de Normalisation). 2005. EN14961-1:2005. Solid biofuels - fuel specification and classes. Part 1 - General requirements. London, UK. pp: 25-33.
- Chacón-Hernández, P. A. y C. F. Vargas-Rodríguez, 2009. Digestibilidad y calidad del *Pennisetum purpureum* cv. King grass a tres edades de rebrote. *Agron. Mesoam.* 20: 399-408.
- Coll, L. C. 2008. La utilización de los residuos frutícolas para obtener bioetanol de Segunda Generación. *Jornadas Técnicas de Frutas y Hortalizas*. Palma de Mallorca-España. <http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/02378.pdf>. (Consultado 2 de noviembre de 2014).
- Demirbas, A. 2004. Ethanol from cellulosic biomass resources. *Int. J. Green Energ.* 1: 79-87.
- Dien, B. S. 2010. Mass balances and analytical methods for biomass pre-treatment experiments. *In: Vertès, A. A., N. Qureshi, H. Blaschek and H. Yukawa* (eds). *Biomass to biofuels: strategies for global industries*. Wiley, Chichester, United Kingdom. pp: 213-231.
- Enríquez, Q. J. F., y Romero, M.J. 1999. Tasa de crecimiento estacional a diferentes edades de rebrote de 16 ecotipos de *Brachiaria* spp. en Isla, Veracruz. *Agrociencia* 33: 141-148.
- Forero, O. 2009. El bagazo de caña de azúcar, petróleo verde del siglo. Documento URL.http://www.dinero.com/seccion-patrocinos/green/bagazo-cana-azucar-petroleo-verde-del-siglo_62876.aspx (Consultado el 23 septiembre de 2014).
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 4ª ed. Instituto de Geografía, UNAM; México. 217 p.
- Godin, B., S. Lamaudiere, R. Agneessens, T. Schmit, J. P. Goffart, D. Stilmant, P. A. Gerin, and J. Delcarte. 2013. Chemical characteristics and biofuels potentials of various plant biomasses: influence of the harvesting date. *J. Sci. Food Agric.* 93: 3216-3224.
- Hakkila, P. 1989. Utilization of residual forest biomass. *Springer Series in Wood Science*. Springer, Heidelberg. New York. 568 p.
- Hernández-Salas, J. M., M. S. Villa-Ramírez, J. S. Veloz-Rendón, K. N. Rivera-Hernández, R. A. González-César, M. A. Plascencia-Espinoza, and S. R. Trejo-Estrada. 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse. *Biores. Technol.* 100: 1238-1245.
- Hodgson, E. M., S. J. Lister, A. V. Bridgwater, J. Clifton-Brown, and I. S. Donnison. 2010. Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of *Miscanthus* in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass Bioenerg.* 34: 652-660.
- Jenkins, B. M., L. L. Baxter, T. R. Miles Jr., and T. R. Miles. 1998. Combustion properties of biomass. *Fuel Process. Technol.* 54: 17-46.
- Kazi, F. K., J. A. Fortman, R. Anex, D. D. Hsu, A. Dutta, and G. Kothandaraman. 2010. Techno-Economic Comparison of Process Technologies for Biochemical Ethanol Production from Corn Stover. *Fuel* 89: 20-28.
- Laser, M., E. Larson, B. Dale, M. Wang, N. Greene, and L.R. Lynd. 2009. Comparative Analysis of Efficiency, Environmental Impact, and Process Economics for Mature Biomass Refining Scenarios. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 3: 247-270.
- Lee, J. M., J. Shi, R. A. Venditti, and H. Jameel. 2009. Autohydrolysis pretreatment of coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. *Bioresource Technol.* 100: 6434-6441.

- Lewandowski, I., and A. Kicherer. 1997. Combustion quality of biomass: practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus* × *giganteus*. Eur. J. Agron. 6: 163-177.
- Lewandowski, I., J. C. Clifton-Brown, B. Andersson, G. Basch, D. G. Christian, U. Jorgensen, M. B. Jones, A. B. Riche, K. U. Schwarz, K. Tayebi, and F. Teixeira. 2003. Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* Genotypes. Agron. J. 95: 1274-1280.
- Mateus, L., O. Hernández, M. Velásquez, y J. J. Díaz. 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto Maralfalfa (*Pennisetum glaucum* × *Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. Revista Colombiana de Biotecnología XIV: 146-156.
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (Part 1): overview of biomass. Biores. Technol. 83: 37-46.
- Murnen, H. K., V. Balan, S. P. S. Chundawat, B. Bals, L. D. C. Sousa, and B. E. Dale. 2007. Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus* × *giganteus* to fermentable sugars. Biotechnol. Prog. 23: 846-850.
- Nava V., M. Morales, and S. Revah. 2007. Cometabolism of methyl tert-butyl ether (MTBE) with alkanes. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 6: 339-352.
- Olanders, B., and B. M. Steenari. 1995. Characterization of ashes from wood and straw. Biomass Bioenerg 8: 105-115.
- ORNL (Oak Ridge National Laboratory). 2006. Bioenergy conversion factors. Available from: <http://www.localenergy.org/pdfs/Document%20Library/Bioenergy%20conversion%20factors.pdf> (Consultado el 30 septiembre de 2014.)
- Parrish, D. J., and J. H. Fike. 2005. The biology and agronomy of Switchgrass for biofuels. Crit. Rev. Plant Sci. 24: 423-459.
- Piccolo, C., and F. Bezzo. 2009. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. Biomass and Bioenerg. 33: 478-491.
- Rincón A. C., M. G. A. Ligarreto, y E. Garay. 2008. Producción de forraje en los pastos *Brachiaria decumbens* cv. amargo y *Brachiaria brizantha* cv. Toledo, sometidos a tres frecuencias y a dos intensidades de defoliación en condiciones del piedemonte llanero colombiano. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 61: 4336-4346.
- Robinson J., J. D. Keating, A. Boussaid, S. D. Mansfield and J. N. Saddler. 2002. The influence of bark on the fermentation of Douglas-fir whitewood pre-hydrolysates. Appl. Biochem. Biotech. 59: 443-448.
- Roger, Q. L. M., A. N Souza, H. Angelo, D. V. A. Teixeira e M. I. Soares 2011. Custo de produção das biomassas de eucalipto e capim-elefante para energia. Cerne Lavras 17: 417-426.
- Rowell, R. M., R. Pettersen, J. S. Han, J. S. Rowell and M. A. Tshabalala. 2005. Cell Wall Chemistry. In: Rowell, R. M. (ed.) Handbook of wood chemistry and wood composites. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp: 35-74.
- Sarath, G., D. Akin, R. Mitchell, and K. Vogel. 2008. Cell-wall composition and accessibility to hydrolytic enzymes is differentially altered in divergently bred switchgrass (*Panicum virgatum* L.) genotypes. Appl. Biochem. Biotech. 150: 1-14.
- SAS Institute. 2002. Statistical Analysis System (SAS). Software v.9.0. User's Guide. N. C., USA. 315 p.
- Schmer, M. R., K. P. Vogel, R. B. Mitchell, and R. K. Perrin, 2008. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 464-469.
- Sendich, E. N., M. Laser, S. Kim, H. Alizadeh, L. Laureano-Perez, B. Dale, and L. Lynd. 2008. Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX). Process and resulting reductions in minimum ethanol selling price. Bioresource Technol. 99: 8429-8435.
- Spatari, S., D. M. Bagley, and H. L. MacLean. 2010. Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. Bioresource Technol. 101: 654-667.
- Sues A., R. Millati, and L. Edebo. 2005. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. FEMS Yeast Res. 5: 669-676.
- Sun, Y., and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review. Bioresource Technol. 83: 1-11.
- TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry). 2007. TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing. Tests T 204 and T 222. Atlanta, GA. U.S.A.
- Thomason W. E., W. R. Raun, G. V. Johnson, C. M. Taliaferro, K. W. Freeman, K. J. Wynn, and R. W. Mullen. 2004. Switchgrass response to harvest frequency and time and rate of applied nitrogen. J. Plant Nut. 27: 1199-1226.
- Valverde, A. G., B. Sarria L., y J. P. Monteagudo Y. 2007. Análisis comparativo de las características físicoquímicas de la cascarilla de arroz. Scientia et Technica 13: 255-260.
- Vamvuka D., E. Kakaras, E. Kastanaki, and P. Grammelis. 2003. Pyrolysis characteristics and kinetics of biomass residuals mixtures with lignite. Fuel 82: 1949-1960.
- Xu, J., J. J. Cheng, R. R. Sharma-Shivappa, and J. C. Burns. 2010. Lime pretreatment of Switchgrass at mild temperatures for ethanol production. Bioresource Technol. 101: 2900-2903.
- Yacobucci, B. D. 2010. Intermediate-Level Blends of Ethanol in Gasoline, and the Ethanol "Blend Wall". Congressional Research Service. <http://fas.org/srg/crs/misc/R40445.pdf> (Consultado el 10 de diciembre de 2014).
- Yin, C.-Y. 2011. Prediction of higher heating values of biomass from proximate and ultimate analyses. Fuel 90: 1128-1132.
- Zhang, T., C. Wyman, K. Jakob, and B. Yang. 2012. Rapid selection and identification of *Miscanthus* genotypes with enhanced glucan and xylan yields from hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis. Biotechnol. Biofuels 5: 2-14.