



ISSN: 1688 - 9258

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
U R U G U A Y

Jornada Técnica

Biomateriales Forestales



Jueves 28 de Agosto de 2014

INIA Tacuarembó

Serie de Actividades de Difusión N° 737



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
U R U G U A Y

Jornada Técnica

Biomateriales Forestales

Instituciones participantes:

- ❖ Secretaría de Innovación y Transferencia de Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (Argentina).
- ❖ Laboratório de Fisiologia Vegetal; Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (Brasil).
- ❖ Dipartimento per la Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università della Tuscia, Viterbo (Italia).
- ❖ Facultad de Química, Universidad de la República (Uruguay).
- ❖ Dirección Nacional de la Propiedad Industrial; Ministerio de Industria, Energía y Minería (Uruguay).

Coordinación:

- ❖ Dra. Zohra Bennadji, INIA, Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal (Uruguay).
- ❖ Dr. Fernando Ferreira, Centro Universitario de Tacuarembó, Facultad de Química, UdelaR (Uruguay).

TABLA DE CONTENIDO

PROLOGO	3
BIOMATERIALES FORESTALES: UNA SÍNTESIS.....	4
SECONDARY METABOLITES: GENERAL CONCEPTS AND EXAMPLES OF APPLICATIONS IN THE FORESTRY SECTOR OF SOUTHERN SOUTH AMERICA.	5
PROYECTO L4: "DE LA BIOPROSPECCIÓN A LA BIOREFINERÍA: DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA LA VALORIZACIÓN DE LA FLORA ARBÓREA NATIVA DEL URUGUAY"... CONTENIDO Y AVANCES.....	7
METABOLITOS SECUNDARIOS DE MADERA DE PROCEDENCIA URUGUAYAS DE ALGARROBOS (<i>Prosopis affinis</i> y <i>Prosopis nigra</i>).....	8
DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL RELACIONADOS AL SECTOR FORESTAL EN GENERAL Y A BIOMATERIALES FORESTALES EN PARTICULAR	10

PROLOGO

Zohra Bennadji¹

A nivel mundial, el advenimiento de una tercera revolución industrial post-petróleo parece inevitable y se manifiesta básicamente a través de cambios registrados en diferentes ramas de la industria tradicional de altos costos en recursos naturales y materias primas. El giro hacia una industria sostenible, intensiva en uso de conocimiento y orientada al diseño de procesos eficientes y a la obtención de productos alternativos con mayor valor agregado configura el principal eje de estos cambios.

El sector forestal no escapa a estas tendencias y, hoy en día, las biofábricas, las biorefinerías, los bioprocesos y la producción de biomateriales conviven cada vez más con las fábricas y los productos maderables tradicionales. Estas tendencias se ven también reflejadas en el mundo académico donde han proliferado, en los últimos años, grupos de estudio e investigación en estas temáticas.

En este contexto, los recursos naturales de los bosques y más específicamente, su biodiversidad, han cobrado un papel clave para la obtención de productos alternativos en diferentes ramas de la industria. La obtención de biomateriales a partir de metabolitos secundarios abre vastos campos de investigación e innovación, ponderados como de alto impacto en ámbitos académicos, empresariales y políticos.

El Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) inició en el año 2013 un proyecto para la identificación y obtención de metabolitos secundarios a partir de especies arbóreas nativas como insumos para la innovación en biomateriales. Su ejecución cuenta con la participación del Polo de Desarrollo de Química del Centro Universitario de Tacuarembó (CUT-UdelaR), además de la colaboración de otras instituciones nacionales e internacionales.

La realización de la primera actividad de difusión de este proyecto apunta al abordaje interdisciplinario de la temática de biomateriales forestales y a la exploración de sus avances y potencialidades para la innovación en el sector forestal del Uruguay, en escenarios de implementación de acciones en bioeconomía y de medidas para la mitigación y la adaptación al cambio climático. Esta Jornada Técnica cuenta con la participación de conferencistas nacionales e internacionales referentes en bioeconomía, valorización del bosque nativo, ejemplos de uso de metabolitos secundarios y derechos de propiedad intelectual relacionados al sector y a los biomateriales forestales. Esta serie de actividad de difusión reúne resúmenes de algunas de sus presentaciones.

¹ Responsable del Proyecto L4 - "De la bioprospección a la biorefinería: Desarrollo de estrategias para la valorización de la flora arbórea nativa del Uruguay"

BIOMATERIALES FORESTALES: UNA SÍNTESIS.

Zohra Bennadji²

Los biomateriales son productos derivados enteramente o, en parte, de biomasa y especialmente diseñados como alternativa al uso de productos obtenidos tradicionalmente a partir de recursos naturales no renovables como el petróleo.

Los biomateriales involucran diversas cadenas de valor, procesos, productos y mercados emergentes en lo que se describe en diferentes ámbitos como la tercera revolución industrial en una era post-petróleo. En el rubro de productos, además de la extendida gama ya disponible de biofármacos, cosméticos y nutracéuticos de origen vegetal, los más estudiados son los bioplásticos, los biocompuestos y las biofibras.

En el caso del sector forestal, el foco está actualmente puesto en productos obtenidos a partir de celuloso, lignina y metabolitos secundarios. Estos se clasifican en bioplásticos, biocompuestos, bioembalajes, biofibras y bioaditivos (adhesivos, barnices, colorantes, protectores sanitarios de la madera etc.) y presentan diferentes estados de avances en sus aplicaciones y usos a nivel regional y mundial. Sin embargo, los estudios indican un marcado liderazgo de Europa en la materia. En Uruguay, los mayores avances se han registrado hasta la fecha en biofármacos, cosméticos y, en cierta medida, en nutracéuticos.

A nivel industrial, la obtención de biomateriales forestales implica el desarrollo y la integración de un conjunto de actividades relacionadas con el diseño de biorefinerías, a la biotecnología, a la química fina y planificación del escalado de los procesos. Estas adecuaciones industriales implican la revisión e innovación en procesos para la creación de nuevos prototipos de biomateriales. Los asuntos de mercados, de certificación y de aceptación de estos biomateriales por el consumidor están también al orden del día. Finalmente, este conjunto de condicionantes implica también diversas adecuaciones de la investigación, tanto básica como aplicada, y retos para la interdisciplinariedad en diferentes campos de la ciencia y tecnología.

Palabras clave: biomateriales forestales, bioeconomía, biorefinería, cadena de la madera.

² Investigadora Principal – Prog. Nac. Investigación en Producción Forestal – INIA Tacuarembó – zbennadji@tb.inia.org.uy

SECONDARY METABOLITES: GENERAL CONCEPTS AND EXAMPLES OF APPLICATIONS IN THE FORESTRY SECTOR OF SOUTHERN SOUTH AMERICA.

Arthur Germano Fett-Neto³

As sessile organisms, plants have been tailored by evolution to produce an array of molecules to protect them from herbivores and pathogens, attract pollinators, reproductive structure dispersers and beneficial microorganisms, as well as to withstand environmental extremes of temperature, water availability, irradiance, and mineral nutrient composition. Most of these unique metabolites, known as secondary metabolites or natural products, are not directly involved in growth and development, but play key roles in the interaction of plants with their environment. Unlike the few hundred primary metabolites known, i.e. directly related with energy production and consumption, secondary metabolites occur by the thousands in plants. This molecular diversity, however, is not evenly distributed throughout the plant taxa, but rather is often restricted to a few families, genera or species. Secondary metabolites arise from primary metabolism precursors, common structural backbones produced by core enzymes and a variety of derivatives produced by the action of modifying enzymes.

The secondary metabolic profile of plants is highly responsive to environmental signals, both biotic and abiotic, which are transduced from external signals to nuclear changes by crosstalking signal transduction pathways, impacting on the enzyme/metabolite cellular profile. Part of this responsiveness is possible due to the organization of enzymes in metabolic channels associated with membranes, such as the endoplasmic reticulum. This arrangement provides faster and more effective catalysis and prevents accumulation and potential spreading of toxic intermediates. A remarkable feature of plant secondary metabolic pathways is that they are frequently expressed in portions, so that some metabolic steps take place in one organ or cell type and others in a different place, which implies on the involvement of intermediate transporters. A comparable pathway distribution spatial complexity is seen at the subcellular level.

Trees are especially interesting as sources of potentially valuable secondary metabolites. Due to their usually longer life span, these plants undergo various reproductive cycles and steadily produce wood and other vegetative tissues. They also need to fend off numerous pathogen and herbivore attacks, attract pollinators, seed dispersers, and rhizosphere beneficial microorganisms, as well as resist a large number of events that can be characterized as environmental extremes. All these features tend to select for metabolic diversity, allowing success of the tree life form. To exemplify this correlation, two cases of terpene producing tree species of southern Brazil, one native and one introduced, will be discussed.

The production of saponins from leaves of *Quillaja brasiliensis*, which are comparable to those of *Quillaja saponaria* barks, both structurally and as immunoadjuvants in vaccine formulations, have been evaluated in relation to stress factors. The content of QB-90 (an immunoadjuvant fraction) in leaf disks was significantly increased by application of different osmotic stress agents. Higher yields of bioactive saponins were also observed upon exposure to salicylic acid, jasmonic acid, ultrasound, and UV-C light. Experiments with shoots indicated a significant increase in QB-90 yields with moderate increases in white light irradiance and by mechanical damage applied to leaves. The increased accumulation of these terpenes may be part of a defense response. These results on the regulation of accumulation of bioactive saponins may point to strategies to improve yields of these useful metabolites.

³ Professor of Botany, Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil - fettneto@cbiot.ufrgs.br

Oleoresin is a key defense strategy of advanced gymnosperms, based on the combination of a complex anatomical structure of resin ducts and elaborate terpene biochemistry. Given the vast array of oleoresin economic applications in the chemical, pharmaceutical, agrochemical, and biofuel industries, translating factors that regulate terpene biosynthesis into higher oleoresin yield is a challenge for the forestry industry. Field tests with slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) tree plantations carried out under the subtropical climate of Southern Brazil examined the seasonal profile of oleoresin production stimulation in response to different chemical adjuvants, after mechanical injury. Yields of trees treated with oleoresin-inducing pastes containing alternative adjuvants were compared to the standard commercial one used on an industrial scale (based on the ethylene-releasing compound – 2-chloroethylphosphonic acid - CEPA). Significant increases in pine oleoresin yield were observed by modulating its biosynthesis and using chemical stimulants affecting defense responses (salicylic acid, benzoic acid), auxins (stimulants of ethylene production and resin canal differentiation), and biosynthetic enzymes (metal cofactors of terpene synthases, iron or potassium). All of these adjuvants could be effectively used as replacements for CEPA, which is a more expensive chemical.

The use of *Quillaja brasiliensis* and *Pinus elliottii* as sources of useful terpenes highlights the importance of moderate levels of stress to stimulate carbon flow towards end products of secondary metabolic pathways, as well as the potential of trees to provide sustainable sources of green chemicals for the pharmaceutical, chemical, agrochemical, and biofuel industries. (Funded by Brazilian agencies CNPq, Fapergs, and a grant-in-aid of research by Irani Celulose S.A.).

Key words: secondary metabolism, terpenes, *Quillaja brasiliensis*, *Pinus elliottii*, stress, regulation.

PROYECTO L4: "DE LA BIOPROSPECCIÓN A LA BIOREFINERÍA: DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA LA VALORIZACIÓN DE LA FLORA ARBÓREA NATIVA DEL URUGUAY" - CONTENIDO Y AVANCES

Zohra Bennadji⁴
Fernando Ferreira⁵
Diana Castillo⁴
Marcelo Alfonso⁴
Luis Panizzolo⁵
Pilar Menéndez⁶
Silvia Soulé⁶

En escenarios mundiales de implementación de la bioeconomía, los recursos naturales de los bosques y más específicamente, su biodiversidad, han adquirido un papel estratégico en diferentes ramas de la industria forestal.

En Uruguay, el monte nativo representa el 44% de la superficie forestada del país, superando levemente las plantaciones actuales con Eucalyptus (40%). Sin embargo, el aprovechamiento de su flora arbórea se ha limitado, hasta ahora, a la simple extracción de productos maderos convencionales.

Los biomateriales incluyen una amplia gama de componentes y/o productos derivados de metabolitos secundarios (taninos, polifenoles, látex, resinas, gomas, etc.) que pueden obtenerse, entre otras fuentes, de árboles del bosque nativo. La obtención de biomateriales a partir de estos metabolitos abre campos de investigación e innovación viables desde diferentes perspectivas.

El Proyecto L4: "De la bioprospección a la biorefinería: Desarrollo de estrategias para la valorización de la flora arbórea nativa del Uruguay" apunta a la identificación y obtención de metabolitos secundarios de especies arbóreas nativas como insumos para la obtención de biomateriales. Este Proyecto, se ejecuta en colaboración con el Polo de Desarrollo Universitario de Química del Centro Universitario de Tacuarembó y otras instituciones nacionales e internacionales; cuenta con cuatro componentes: uno de gestión, un segundo de bioprospección, un tercero de desarrollo de técnicas biotecnológicas de masificación de plantas y, finalmente, un cuarto de identificación y análisis químico de metabolitos secundarios.

A la fecha, se ha avanzado en la identificación de tres especies promisorias con potencial de obtención de metabolitos secundarios: *Quillaja brasiliensis*, *Prosopis affinis* y *Prosopis nigra*. Por otra parte, se han realizado salidas de prospección, herborización y colectas de muestras y se ha avanzado en el desarrollo de protocolos de aislamiento y caracterización a escala analítica de metabolitos secundarios de interés.

Palabras clave: metabolitos secundarios, flora arbórea nativa, *Quillaja brasiliensis*, *Prosopis affinis*, *Prosopis nigra*.

⁴ INIA Tacuarembó – zbennadji@tb.inia.org.uy; dcastillo@tb.inia.org.uy; malfonso@tb.inia.org.uy

⁵ Centro Universitario de Tacuarembó - ff@fq.edu.uy; apanizzolo@gmail.com

⁶ Facultad de Química – UdelaR - pilimenendez@gmail.com; ssoule@fq.edu.uy

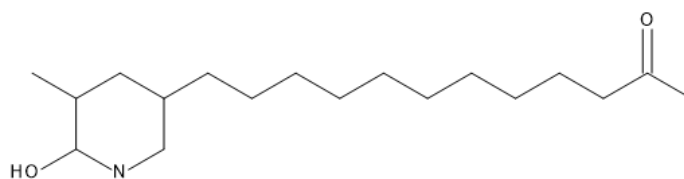
METABOLITOS SECUNDARIOS DE MADERA DE PROCEDENCIAS URUGUAYAS DE ALGARROBOS (*Prosopis affinis* y *Prosopis nigra*).

Luis Reina⁷
Pilar Menéndez⁷
Vittorio Vinciguerra⁸
Zohra Bennadji⁹
Diana Castillo⁹
Marcelo Alfonso⁹
Fernando Ferreira¹⁰

El género *Prosopis* se encuentra ampliamente distribuido en América, África y Asia. Este género abarca múltiples especies que se encuentran presentes en casi todos los países de América. En el Uruguay existen dos especies de este género las cuales se encuentran bajo estudio en la actualidad; ellas son *Prosopis affinis* Spreng. (Ñandubay) y *Prosopis nigra* Griseb. (Algarrobo). De estas especies se ha comenzado a estudiar la estructura de la lignina y la composición de algunos de sus metabolitos secundarios.

En el caso de la lignina, se estudió la estructura de ésta mediante pirólisis-cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (Py-GC-MS). A través de este análisis se pudo establecer una relación entre las unidades siringílicas y guayacilicas (S/G) de 0.5 para el *P. affinis* y 1.1 para el *P. nigra*. Sumado a lo anterior, fue posible, mediante el uso de herramientas estadísticas como el análisis de componentes principales, discriminar entre muestras de ambas especies tanto de madera como de corteza. Esto se logró utilizando como variables para dicho análisis la abundancia relativa de distintas unidades siringílicas y guayacilicas obtenidas por pirólisis.

Por otro lado, se estudió el extracto lipofílico de corteza mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masas identificándose para ambas, ácidos grasos así como esteroides como estigmasterol y β -sitosterol. Además se buscaron específicamente alcaloides, dado que en bibliografía se reporta la presencia de éstos dentro del género *Prosopis* (1,2). En el caso de las muestras analizadas de *P. affinis* se encontró una mezcla de múltiples alcaloides en una proporción de 0.01%. En el caso del *P. nigra* se encontró un alcaloide principal el cual fue identificado tentativamente mediante comparación de su espectro de masa como Cassina. La proporción de alcaloides para esta especie fue de 0.1%.



Cassina

Bibliografía:

1) Singh, S.; Verma, S.K. 2012. Study of the distribution profile of piperidine alkaloids in various parts of *Prosopis juliflora* by the application of Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry (DART-MS). *Nat. Prod. Bioprospect.* 2: 206–209.

⁷ Facultad de Química – UdelaR - rluis@gmail.com; pilimenendez@gmail.com

⁸ Universidad de Tuscia, Viterbo (Italia) – vincique@unitus.it

⁹ INIA Tacuarembó – zbennadji@tb.inia.org.uy; dcastillo@tb.inia.org.uy; malfonso@tb.inia.org.uy

¹⁰ Centro Universitario de Tacuarembó - ff@fq.edu.uy

2) Khuong-Huu,Q.; Ratle, G.; Monseur, X.; Goutarel, R. 1972. Alcaloydes piperidiniques, II. Structures de la prosopine et de la prosopinine,alcaloydes du Prosopis africana (guill. et perr.) taub. *Bull. Soc. Chim. Belges* 81: 425-442.

Palabras clave: *Prosopis nigra*, *Prosopis affinis*, corteza, lignina, cassina, Uruguay.

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL RELACIONADOS AL SECTOR FORESTAL EN GENERAL Y A BIOMATERIALES FORESTALES EN PARTICULAR

Ma. Laura Glisenti¹¹

Se presentará un resumen del informe “El potencial impacto de los derechos de propiedad intelectual sobre la cadena forestal en Uruguay” elaborado por el Comité de Desarrollo y Propiedad Intelectual (CDIP) de la OMPI (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual) en el año 2013; específicamente respecto a la aplicación de los derechos de propiedad intelectual a las distintas etapas de la cadena productiva forestal.

Asimismo, se presentarán las tendencias a nivel mundial en la protección por patente de los biomateriales forestales.

Palabras clave: propiedad intelectual, patentes, cadena forestal, biomateriales, Uruguay.

¹¹ Dirección Nacional de la Propiedad Industrial, MIEM – lglisenti@dnpi.miem.gub.uy