

TRIANA, URIBE & MICHELSEN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-111673- -00006-0000

Fecha: 2012-12-13 16:27:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 96

SEÑOR DIRECTOR,
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

REFERENCIA : EXPEDIENTE N° 09 -111673
ASUNTO : RESPUESTA AL OFICIO 16515 DEL 14 DE SEPTIEMBRE
DE 2012 A LA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
TITULADA "PLANTA DE TABACO MUTAGENIZADA
COMO CULTIVOS DE SEMILLAS PARA LA
PRODUCCION DE ACEITE PARA USOS ENERGETICOS
INDUSTRIALES Y ALIMENTICIOS".
SOLICITANTE : AEP-ADVANCED ECOPOWER PATENTS SA.

JUAN CARLOS URIBE RESTREPO, mayor de edad, domiciliado en la ciudad de Bogotá D.C., República de Colombia, abogado titulado e identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de apoderado de AEP-ADVANCED ECOPOWER PATENTS SA, atentamente manifiesto que estando dentro del término de ley y por orden expresa de mis representados, como resultado del examen de fondo realizado con fundamento al artículo 45 de la decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones, me permito presentar respuesta al Oficio de la referencia, bajo los siguientes.

1. REQUISITOS DE FORMA

- 1.1 El señor examinador se refiere a que el título no es claro y que se debe modificar puesto que no incluye los componentes. Para tal efecto, presento a ese despacho el título corregido con base en dicha sugerencia: **"MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA PLANTA DE TABACO MUTAGENIZADA DE ALTA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE SEMILLAS"**.
- 1.2 Seguido, el señor examinador afirma que las reivindicaciones 1 a 6 y 12 se refieren a materia no patentable con base en el *Artículo 20*, literal *c*, de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones por referirse a que no serán patentables las plantas, los animales y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos. De igual forma se refiere a que las reivindicaciones 7, 8 y 13 no son patentables por referirse al uso con base en el artículo 14 de la nombrada Decisión 486. Adicionalmente, el señor examinador se refiere a que la reivindicación 11 no es clara por qué no describe la estructura de los vectores de transformación y define que el literal g) no es patentable con base en la norma.

Calle 93B No. 12-48 P. 4 • Bogotá D.C., 110221 Colombia
Tel: (571) 601 9660 - 621 5810 • Fax: (571) 611 4209 - 635 1914
e-mail: tum@tumnet.com • Website: www.tumnet.com



Igualmente agrega que las reivindicaciones 18 a 23 no son claras puesto que no caracterizan la materia a proteger por sus componentes y proporciones.

- 1.3 En respuesta a tales requerimientos, nos permitimos presentar a ese despacho un nuevo capítulo reivindicatorio con el fin de precisar y limitar la invención dentro de la Norma. Dicha modificación comprende:

1.3.1 Las reivindicaciones 1 a 8 y 12 tal y como se había presentado, en referencia a las plantas y las semillas han sido eliminados y las reivindicaciones siguientes se han reenumerado en consecuencia. Por lo tanto, las reivindicaciones 9 y 10 originalmente presentadas inicialmente ahora corresponden a las nuevas reivindicaciones modificadas 1 y 2 y se han redactado y reenumerado definiendo el método con base en las sugerencias presentadas por ese despacho.

1.3.2 Por lo tanto, las reivindicaciones dependientes de estas nuevas principales, ahora comprende las reivindicaciones 3 a 19, teniendo en cuenta que se han reformado aquellas que antes se referían al uso o se ha precisado la materia sobre la cual busca protección según el caso y todas se han reenumerado de manera que aquellas presentadas originalmente como 11 y 13 a 23, ahora corresponden a las reivindicaciones 8 a 19.

- 1.4 Respecto a la descripción, el señor examinador se refiere a que no define el biodiesel y los complementos alimenticios por sus componentes o características. De igual forma, indica que la descripción menciona plantas transformadas con vectores que codifican enzimas de interés para modificar la composición y cantidad de aceite producido por la semilla de la planta en el folio 48, pero no divulga cuales son esos vectores usados ni cuales las secuencias recombinantes introducidas. En ese sentido, remito al señor examinador a la descripción, para precisar dichos requerimientos, donde afirma que dicha planta se transforma por modificación en los puntos e) y g) con uno o más vectores de expresión que comprende un:

“casete de expresión específico de semilla que comprende, ordenados desde 5' a 3' una secuencia de ADN que codifica para un promotor de un gen específico de la planta para la expresión en órganos de almacenamiento de semillas; una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de señales de una proteína de la planta capaz de dirigir dicha proteína al retículo endoplasmático (ER); una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de señales capaz de dirigir la proteína al plástido o una secuencia



de ADN que codifica para una secuencia de señal capaz de anclar la proteína a la ER; una secuencia de ADN que codifica para una proteína seleccionada del grupo que comprende los genes la acetil-CoA carboxilasa (ACCase), aciltransferasa de diacil-glicerol (DGAT), lisofosfatidato aciltransferasa (LPAT), fosfatidato fosfohidrolasa (PAPasa), proteína transportadora de acilo (ACP), malonil-CoA: ACP transacilasa, cetoacil-ACP sintasa (KAS), cetoacil-ACP reductasa, 3-hidroxiacil deshidrogenasa ACP, e noí I-ACP reductasa, Esteroil-desaturasa ACP, acil-tioesterasa ACP, glicerol-3-fosfatoaciltransferasa, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, citidina-5-difosfato sintasa diacilglicerol, sintasa glicerofosfato fosfatidil, fosfatidil glicerol-3-fosfato fosfatasa, FA O 1-8 desaturasa, fosfatasa de ácido fosfatídico, monogalactosil sintasa glicerol diacilo, digalactosil sintasa glicerol diacilo, proteínas de biosíntesis sulfolípida, sintasa acil-CoA de cadena larga, glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), diacilglicerol colina fosfotransferasa, sintasa de fosfatidilinositol, acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa, acil-ACP desaturasa, desaturasa lineoilo, desaturasa esfingolípidos, oleato 12-desaturasa, acetilenasa de ácidos grasos, epoxigenasa de ácido graso, diacilglicerol quinasa, colina fosfato citidil transferasa, colina quinasa, fosfolipasa, descarboxilasa fosfatidilserina, fosfatidilinositol quinasa, cetoacil-CoA sintasa, factor de transcripción CER, oleosina, 3-cetoacil-CoA tiolasa, acil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa, acil-CoA oxidasa, y una señal de poliadenilación”.

Ahora bien, para definir el producto biodiesel, la descripción expresa que se produce a partir de:

“la producción de biomasa para la conversión bioquímica o para la conversión termoquímica por combustión directa, carbonización, pirólisis, gasificación, digestión anaerobia, digestión aerobia, fermentación alcohólica o procedimientos de explosión de vapor”.

Y adelante define que para producir el biodiesel, se:

“produce una torta de aceite resultante del prensado de la semilla que, como alternativa a su uso en alimentación animal, puede utilizarse como combustible sólido precipitado en las plantas de carbón o biomasa granulados debido a su poder calorífico superior a 4.950 Kcal./Kg”



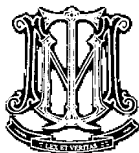
En materia de alimento define que:

“produce una torta de aceite, resultante del prensado de la semilla, con un contenido de aceite de forma variable de alrededor del 6 a 12% y un contenido de proteínas de alrededor del 35%, que es ideal para la oferta alimentaria de alimento para animales debido a su alto contenido de ácidos grasos de omega 6 (ácido linoleico)”.

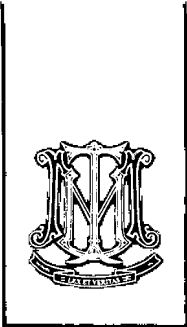
- 1.5 Las modificaciones propuestas en las reivindicaciones se establecen conforme lo solicita el señor examinador en su escrito, de manera que estos cambios y la nueva redacción de las reivindicaciones, no implican una adición a la invención inicialmente propuesta, sino que hace referencia a las indicaciones del señor examinador con el fin de precisar y aclarar la invención.

2 LA INVENCION REIVINDICADA Y LA EXCEPCION A LA PATENTABILIDAD INDICADA.

- 2.1 Es de aclarar que la descripción de la presente solicitud enseña paso a paso un método para obtener una gran cantidad de semillas de plantas de tabaco, las etapas de mutación (por ejemplo, por mutagénesis química de las semillas, ya sea por inducción de mutagénesis somática in vitro), los pasos de selección y todos los pasos definidos en las reivindicaciones que caracterizan el método (por favor, tener en cuenta que la proyección de producción se hace comúnmente mediante la siembra de metros cuadrados y no por hectáreas de terreno con la consecuente extrapolación de los resultados a escala por hectárea). La invención también proporciona ejemplos específicos para cada etapa del método. Por lo tanto, el soporte completo para llevar a cabo el método de la invención se proporciona en la descripción.
- 2.2 En la comunicación emitida por ese despacho, el señor examinador ha argumentado que también las reclamaciones 9 a 11 se refieren a métodos no patentables puesto que supuestamente se refieren a métodos "esencialmente biológicos".
- 2.3 En principio, se puede argumentar que si un proceso contiene, dentro de las etapas de cruzamiento sexual y selección, una etapa adicional de naturaleza técnica, en la cual el paso por si mismo introduce una característica en el genoma o modifica una característica en el genoma de la planta producida, de modo que la introducción o modificación de esa característica no es el resultado de la mezcla de los genes de



las plantas elegidas para cruzamiento sexual, entonces el proceso no puede ser considerado como un "*procedimiento esencialmente biológico*". En el presente caso, los experimentos y análisis llevados a cabo por el inventor para hacer las plantas de la invención, demuestran que la característica de "*alta producción de semillas*" ha sido gracias a la introducción por mutagénesis en comparación con la planta que antes de la mutagénesis, producía drásticamente menos semillas. Los pasos subsiguientes selectivos conllevados en el producto mutagenizado, permite la identificación de la alta producción de semillas mutantes obtenidas. Por lo tanto, la característica de la "*alta producción de semillas*", es el resultado concreto realmente alcanzado y fácilmente controlable por medio de detección simple entre las plantas tratadas. Así, el método comprende una etapa que tiene un impacto decisivo sobre el resultado obtenido, llevado a cabo por el hombre, que no está calificado como un cruzamiento sexual y una selección y por el contrario tiene un carácter técnico, ya que requiere la presentación de las plantas para la mutagénesis química o física, sin que las plantas no produzcan una cantidad de semillas mayores que los reportados en la literatura (por ejemplo, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000 kilogramos por hectárea cuando se siembra en la condición establecida en el experimento 1 de 100000 plantas/ha o como se describe en la página 9 a una densidad de alrededor de 125.000 plantas/ha). Como se desprende de los datos experimentales, las plantas antes de la etapa de mutagénesis no muestran las mismas características de las plantas seleccionadas después de los pasos de mutagénesis. Estos datos demuestran que tanto la etapa de mutagénesis reivindicada es esencial para la obtención de la introducción de las nuevas características en el genoma. Además, el método comprende una etapa de reconstitución in vitro de la planta a partir de un callo obtenido a partir de células de la hoja, lo que permite obtener una planta homogénea, que lleva el rasgo deseado en todos los tejidos, (cfr. la etapa c. del método), la cual no puede ser clasificado como un método esencialmente biológico. El hecho de un método que comprende la etapa a. en el que la mutagénesis es inducida artificialmente, y el paso c. de la reconstitución in vitro de una planta a partir de un callo mesófilo, comprende también una etapa de selección de los mutantes deseados obtenidos en a. y de la selección ulterior de las plantas manteniendo los caracteres deseados obtenidos en c. no se puede transformar un método tecnológico en un proceso esencialmente biológico. Como se indica en la siguiente tabla, anexa con carácter ilustrativo, informa los "*mejores mutantes*", con varias plantas que han sido obtenidas por el solicitante con las propiedades deseadas con el método descrito y reivindicado en la presente solicitud. Las plantas se han obtenido por el cruce ya sea dentro de la misma especie o entre especies por cruce y presentando preferiblemente las semillas a mutagénesis química o física, o bien presentando el ápice vegetativo a mutagénesis somática in vitro y, posteriormente, por la



regeneración de las plantas mutadas. Ambos procedimientos son conocidos por causar alteraciones en el ADN. La posterior selección y cruce opcional se llevan a cabo con el fin de identificar qué las plantas mutadas objetivamente tienen el fenotipo deseado y con el fin de verificar la herencia de la misma. Los datos experimentales proporcionados en la presente memoria a continuación demuestran que la etapa de alteración del ADN es esencial para obtener un fenotipo de alta producción de semilla lo que no se logró sin el mutagenizado de la planta. Mutantes nombrados como pLT103 y pLT100 se obtuvieron a partir de hojas comerciales, de las variedades que tienen una producción máxima de unos 1000 kg de semillas/ha, (TC528, TC 531, TC 542 en promedio de producción de 850 kg semilla/ha), mientras que las plantas pLT104 (N. tabacum x N. sylvestris), pLT102 (N. tabacum x N. quadrivalvis), pLT101 (N. tabacum x N. tomentosiformis), todo parental, con excepción de N. tabacum, que produce menos que 500 kg/ha, donde las semillas fueron obtenidas por cruzamientos interespecíficos que producen plantas estériles (es decir, sin semillas) y que fueron sometidos a mutagénesis somático in vitro mediante métodos de cultivo de embriones e inducción poliploids por tratamiento con el mutágeno colchicina (ver la página 8 de la solicitud presentada originalmente), dando lugar a las plantas presentan en la tabla a continuación. Los mutantes se seleccionaron de acuerdo con los parámetros reivindicados y la selección final para verificar la productividad de las semillas se hizo en invernadero en una parcela de 10 m2, donde se calculó la densidad de las plantas en escala (12,5 plantas/m2 equivalente a 125000 plantas/ha) (1 ha = 10.000 m2). Varios individuos con un fenotipo de alta producción de semilla se obtuvieron y como ejemplo se presentan en la tabla siguiente:

CRUZAMIE NTO	Densida d (planta/ m2)	Semilla/pl anta (gramos)	Kg de Semil la/ Ha	Método	Densida d (planta/ m2)	Semilla/pl anta (gramos)	Kg Semil la/ Ha	Nombr e del Lab. de mutaci ón
TC528xTC53 1	12.5	10.0	1250	Mutagene sis Química y Selección.	12.5	45.97	5746	PLT 103
TC528xTC54 2	12.5	9.5	1187	Mutagene sis Química y	12.5	35.61	4451	PLT 100



				Selección.				
N. tabacum x N. sylvestris	12.5	0	0	Mutagene sis Somática in vitro y Selección.	12.5	34.69	4336	PLT 104
N. tabacum x N. quadrivalvis	12.5	0	0	Mutagene sis Somática in vitro y Selección.	12.5	32.76	4095	PLT 102
N. tabacum x N. tomentosiform is	12.5	0	0	Mutagene sis Somática in vitro y Selección.	12.5	32.00	4000	PLT 101
TC 501 Leaf variety (control)	12.5	6.8	850	SIN EVENTO DE MUTACI ON	12.5	6.8	850	

La tabla a continuación presenta una densidad de semillas por m2 y la producción de semillas calculado por hectárea (ha) de las plantas experimentales en comparación con las semillas de alta producción por hectárea (ha) que se revela en la técnica anterior.

2.4 Respetuosamente, llamo la atención a ese despacho, el hecho que como se define normalmente en genética, las mutaciones se definen como cambios heredables en el material genético y no es causado por la recombinación o la segregación (de hecho, la producción de semillas de las plantas antes de la mutagénesis era o bien la producción de semillas estándar para las variedades de hoja pero no para la producción en todos los híbridos). Los resultados experimentales obtenidos en las parcelas también están apoyados por los resultados obtenidos en campo abierto donde el Mutante pLT103 tuvo los siguientes resultados, donde el ensayo se inició en octubre de 2009, cuando las condiciones meteorológicas (temperatura de la noche era entre 9 y 12°C y la temperatura del día era entre 15 y 25°C), según un



profesor experto de la Estación Experimental del Tabaco, no eran adecuados para el tabaco, pues por lo general se siembran en abril en esa zona, donde:

- 2.4.1 La parcela está en campo abierto y se trasplantan las plantas de 15-20 cm de altura.
 - 2.4.2 Acerca de 760 metros cuadrados se utilizaron para el ensayo con una densidad de 80.000 plantas por hectárea (50 cm entre las filas y 25 cm de distancia entre sí en la fila).
 - 2.4.3 Las plantas estaban listas para el trasplante en diciembre.
 - 2.4.4 La primera cosecha se ha hecho el 12 de mayo con 100 plantas elegidas al azar, con corte de la inflorescencia hacia la última hoja.
 - 2.4.5 El peso promedio de semillas por planta fue de 140 gr.
 - 2.4.6 Se consideran 80.000 plantas / Ha para producir 11,2 Ton / Ha.
 - 2.4.7 Sin embargo, con el control del número de plantas hecho el 12 de mayo (considerando falacias y la irregularidad del diseño de trasplante) el número total de plantas debe ser un poco más de 60.000 plantas / ha, con una producción estimada de 8,4 Ton / ha.
 - 2.4.8 Las plantas se mantendrán durante la segunda cosecha que debería estar listas en 60 días.
 - 2.4.9 El área de la prueba se utiliza normalmente para el ensayo del tabaco y las enfermedades endémicas en que los suelos son: TMV, la mancha anular, Phytophthora y Peronospora (entre otros).
 - 2.4.10 No hay rastro de virus y hongos presentes en las plantas.
- 2.5 De acuerdo con el resultado obtenido en el campo, hay una producción promedio de alrededor de 1400 Kg de semillas/ha por 10000 plantas/ha (véanse los puntos 2.3.6 y 2.3.7 anteriores). El cálculo se hace fácilmente de la siguiente manera: En el ítem 2.3.6 anterior, se informa una densidad de 80.000 plantas/ha con una producción de 11200 kg/ha, esto significa que 80.000 producen 11200 kg de semillas que resulta en una producción de $11200:8 = 1400$ Kgs por 10.000 plantas. Asimismo, el punto 2.3.7 informa una densidad de 60.000 plantas/ha con una



producción de semillas de 8400 kgs/ha, esto significa que las plantas producen 60.000 8400 kg de semillas que resulta en una producción de $8400:6 = 1400$ kg de semillas por 10.000 plantas. Una densidad de plantas como se describe en las reivindicaciones (100.000 plantas/ha) proporcionaría una producción de 14000 Kg / ha. Como se desprende de los datos experimentales anteriores, no sólo las plantas de la invención se pueden obtener de una manera repetible por el método descrito, sino que es posible obtener varias plantas de alta producción de semillas, con lo que la etapa de mutación se demuestra y es esencial para proporcionar las plantas de alta producción de semillas según la materia reivindicada. En los casos en los que se indujo mutación química, la producción de semillas de la planta antes de la mutación estaba dentro de la productividad de los rangos reportados en la literatura, en el caso de mutagénesis somática in vitro, llevada a cabo según la tabla anterior, las plantas antes de la etapa de mutagénesis no mostraron las características de las plantas seleccionadas después de los pasos de mutagénesis, demostrando así que la etapa de mutagénesis reivindicado es esencial para la obtención de la introducción de los nuevos rasgos en el genoma.

- 2.6 Así las cosas, de lo anterior se desprende que el procedimiento reivindicado no entra en la definición de "*procedimiento esencialmente biológico*", por lo que si es objeto de patente con base en la norma, la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones.
- 2.7 Por lo tanto, los cambios a las reivindicaciones del nuevo capítulo anexo a la presente, están encaminados en este sentido, con base en los argumentos antes expuestos, esperando sea acogido por ese despacho y en consecuencia, no sea objetado como un procedimiento esencialmente biológico.

3. ANÁLISIS DE PATENTABILIDAD.

- 3.1 Respecto al examen de patentabilidad, el señor examinador hace referencia los siguientes documentos del estado de la técnica:
- D1 – EP0257993. 1988.
 - D2 – PLANT CELL PHYSIOL. 2002. Pág: 1518 - 1525.
 - D3 – HOWTOPEDIA. 2008.
 - D4 – BIOMASS AND BIONERGY. 2005.
- 3.2 Conforme se ha definido en el Oficio, el señor examinador alega que la materia descrita en la reivindicación 11 no son nuevas pues lo contenido está revelado con



anterioridad en los documentos D1 y D2; que las reivindicaciones 14 a 18 no son nuevas pues se ven afectadas por el documento D3; y, que la cláusula 19 no es nueva frente al documento D4.

- 3.3 Respecto al documento D1, divulga un fragmento de ácido nucleico que codifica un acetolactato sintasa que proporcione resistencia a herbicidas. Este fragmento de ácido nucleico contiene al menos una mutación de nucleótidos que resulta en un cambio de aminoácido en una de las siete regiones de homología conservadas sustancialmente. Esta mutación da como resultado la producción de una proteína acetolactasa sintasa que contiene mayor resistencia a los compuestos herbicidas de sulfonilurea en comparación con la proteína de tipo silvestre. D2 revela por su parte plantas de tabaco que contienen genes que codifican para Acetyl-CoA Carboxilasa que se encuentra relacionado con el metabolismo de ácidos grasos de la semilla, y evalúa la producción de dichos compuestos en la planta transformada y en su progenie.
- 3.4 Como tal, con base en los documentos D1 y D2, afirma el señor examinador entonces que la mutación de las plantas con el fin de desarrollar fenotipos deseados según la reivindicación 11 se utiliza con frecuencia en la técnica anterior, basado en la evidencia del procedimiento de mutagénesis de dichas anterioridades. El señor examinador ha dirigido su comparación a la utilización de mutagénesis con el fin de obtener un fenotipo deseado pero, por un lado considera sólo los pasos de cruce (cuando objeta la "biológica esencial" la naturaleza del método y la no patentabilidad con base en la norma) y en el otro lado considera sólo la parte del método de mutagénesis, privándolo de los pasos esenciales (tal como el g) que, en conjunto, proporcionan el resultado deseado. Según la presente invención, el método indica que la planta debe ser mutada y proporciona, después de la mutación, la enseñanza de los parámetros fenotípicos que permiten que el experto en la materia pueda identificar las plantas con los caracteres deseados después de dicha mutagénesis, con la debida aplicación que permite al experto en la materia obtener plantas que producen una cantidad de semillas que nunca se ha descrito en la técnica anterior. Ninguna enseñanza de la técnica anterior sugiere la presente solución de la mutagénesis de semillas y la regeneración in vitro de mesófilo junto con los pasos de selección que figuran en la actual nueva reivindicación 1, de manera que pueda proporcionar altas producciones de semillas de tabaco. El método por lo tanto no se puede objetar simplemente en el hecho de que la mutagénesis es una técnica conocida también para las plantas. Por lo tanto, el señor examinador no ha proporcionado un único documento que enseña a transformar plantas de tabaco en biofarma para la producción de semillas (semilla es siempre un subproducto en la técnica anterior) y la forma de lograr este



objetivo. Además, el examinador no ha proporcionado la técnica anterior que enseñe o sugiera el fenotipo de la planta que el experto tiene que seleccionar con el fin de obtener la mas adecuada, como mutante de alta producción. Por el contrario, los documentos citados hacen referencia exactamente es a la técnica anterior puesto que enseñan que las plantas individuales que expresan el doble de la cantidad de semillas con respecto a la planta de la que derivan, son las plantas de Madoka et al., 2002. Plant Physiol celular. 43:1518-1525 (citado en el informe como D2) de manera que en la página 1522, última línea de la columna 1 y la primera línea de la columna 2, que *"las plantas transgénicas eran indistinguibles de los de tipo salvaje"* fenotípicamente mientras que el método de la invención enseña un fenotipo bien definido que el experto tiene que buscar durante la selección de los mutantes adecuados. Por lo tanto, la objeción afirmando que el método es "no es novedoso" resulta infundado y sin apoyo.

- 3.5 En principio, todos los documentos citados en el informe de búsqueda indican que las semillas de tabaco son productos de desecho de la industria del tabaco (Documento D2). Este documento D2, enseña que las plantas de tabaco con la producción de semillas se duplicó. El experto en la materia, a partir de la técnica anterior no tendría ninguna enseñanza de que la planificación de la producción de tabaco mediante la combinación de las enseñanzas de D1 y D2. Ninguno de los documentos enseña o sugiere que las plantas deberían ser modificadas por mutagénesis con el fin de producir más semillas, y ninguno de los documentos enseña que la mutagénesis y la selección de un fenotipo particular podría dar lugar al producto deseado. Los datos proporcionados anteriormente, sin embargo, demuestran que la invención reivindicada permite la producción reproducible de las semillas de alta producción de plantas que tienen una producción de semilla, como se describe en la solicitud.
- 3.6 El documento D3, se refiere a la producción de aceite de semillas. La Tabla 1 del presente documento indica claramente aceites de interés común, mientras que en la página 1 del documento D3 da otra lista de aceites comúnmente interesantes, como el de maíz, de girasol, de soja, coco, semillas de mostaza, de maní, de nueces de Brasil y nueces de macadamia. No obstante, todas las semillas enumeradas en D3 son semillas que tienen un tamaño extremadamente mayor que el tamaño de las semillas de tabaco. En la descripción de la presente solicitud, se hace constar expresamente que: *"El método indicado anteriormente tiene, sorprendentemente, un rendimiento mayor que 70%, que es un rendimiento totalmente inesperado, dicho después de usar métodos de prensado sobre las semillas tan pequeñas como las del tabaco. En la presente invención, en el que las plantas que tienen una alta producción de semillas se seleccionan con el objetivo de aumentar la producción*



de aceite de tabaco por planta, el descubrimiento de que el método de prensado aplicada sobre semillas de tabaco tiene un rendimiento comparable con el rendimiento obtenible en semillas grandes de tamaño". Por lo tanto la novedad es el alto rendimiento de un método que, en las semillas que tienen el tamaño de las semillas de tabaco no es sugerido normalmente. En apoyo de esta afirmación, proveemos el documento Anexo 1 publicado en Eur. J. Lipid Sci.. Technol. 2009, 111, 513-518 y por Stanisavljevic 'al., el que indica en la página 1, columna 2, párrafo segundo, que la extracción de aceite de tabaco por presión en frío es nuevo y es, sorprendentemente, el método de extracción más eficaz en comparación con otros métodos comúnmente utilizados para el tabaco.

- 3.7 Ahora bien, el documento D4, revela las características de producción de biodisel que procede de aceite de semillas de tabaco que han sido transterificado con metanol. Según la presente invención, los resultados experimentales, muestran que hay una gran diferencia entre el aceite extraído mecánicamente y el extraído químicamente. En particular, en el contenido de cera en el informe 11LA01742 (Mecánica) (Anexo 2), la primera línea reporta valores de 64,4 mg / kg en comparación con la cantidad de cera en el aceite de extracción química (método de la técnica anterior) protocolo 11LA01745 (Anexo 3) que el contenido de ceras es de 530,2 mg / kg. El contenido de cera extremadamente bajo del aceite extraído mecánicamente hace el aceite inmediatamente adecuado para transterificación con metanol sin otras etapas de purificación y hace que el aceite sea preferible como biocombustible con un punto de fluidez (cfr. Tabla 2) que es mucho menor que la del punto de vertido de aceite de tabaco descrito en la técnica (véase la Tabla 3 del anexo 5) como el aceite de la invención se caracteriza por un punto de fluidez de -18 ° C frente a un punto de congelación de -14 ° C como da a conocer en la técnica anterior. Por su parte, también adjuntamos el Anexo 4 que también enseña que el punto de fluidez es crucial para biodiesel, ya que no es deseado que el combustible se solidifica a bajas temperaturas, por ejemplo, en invierno. Por lo tanto el aceite obtenido por presión es extremadamente ventajoso por varias razones. Por último, pero no menos importante, la cantidad total de ácidos grasos oxidados es de un 2,13% en la extracción mecánica frente a un 9,51% con la extracción de productos químicos. Otra diferencia en el aceite extraído mecánicamente (Anexo 4) muestra un contenido de ácido graso libre de 0,27% (otros datos muestran que el promedio da un máximo de 1% de contenido de ácidos grasos libres que es equivalente a un índice de acidez mg de KOH / g de alrededor de 2) que, es extremadamente baja y es adecuado para los combustibles, así como para los suplementos dietéticos.



- 3.8 Es importante aclarar que todos los anexos aportados con la presente, buscan coadyuvar como prueba de novedad respecto al arte anterior y todos pertenecen a publicaciones posteriores al 14 de marzo de 2007.
- 3.9 En conclusión, es evidente que no sólo el método de las reivindicaciones se considera objetivamente nuevos e inventivo por las personas expertas, sino también que el aceite obtenido con dicho método tiene características químicas y físicas que lo hace fácilmente distinguible de la del aceite extraído químicamente conocidos en la técnica y que dichas características son deseables en un aceite para ser usado sólo o en combinación con otros materiales, como biocombustible o para los usos reivindicados en la presente solicitud.
- 3.10 Así, basándose en los argumentos establecidos en la presente respuesta y con las modificaciones propuestas en el nuevo capítulo reivindicatorio, los solicitantes creen que los documentos D1 a D4 no anticipan el objeto de la presente invención, ya que no describen un método tal y como el que aquí se reclama. Por lo tanto, estos documentos no son perjudiciales respecto al requisito de NOVEDAD de la invención, ni contradice cualquier disposición legal o reglamentario.
- 3.11 En consecuencia, a la luz de todo lo anterior, me permito solicitar a ese despacho, esta solicitud sea concedida conforme el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Sin embargo, incluso si el examinador lo considera insuficiente en conjunto con las nuevas reivindicaciones o el razonamiento que aquí se presenta, la solicitante ruega respetuosamente que se le ofrezca una nueva oportunidad, a través un nuevo Oficio para expresarse sobre cualquier tema en controversia.

4. FUNDAMENTO DE DERECHO

Fundamento esta remisión en las normas legales siguientes:

- 4.1 Numeral 1 del artículo 586 del Código de Comercio.
- 4.2 Artículo 43 de la Decisión 486 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena.
- 4.3 En las demás normas concordantes.



TRIANA, URIBE & MICHELSEN

2 ANEXOS.

- 2.1 Nuevas reivindicaciones.
- 2.2 Anexo 1: comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil.
- 2.3 Anexo 2: informe 11LA01742.
- 2.4 Anexo 3: protocolo 11LA01745
- 2.5 Anexo 4: informe 10LA01350
- 2.6 Anexo 5: tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: physical and chemical properties

3 NOTIFICACIONES

Para efectos de notificaciones que por disposición del artículo 50 del Decreto 01 de 1984 debe hacer su Despacho, informo que mi representada y la suscrita recibiremos notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mis oficinas de abogado situadas en la Calle 93B No. 12-48 P.4 de la ciudad de Bogotá D.C.

Del Señor Superintendente,


JUAN CARLOS URIBE RESTREPO
CC. No. 79.159.313
T.P.A. 54.493 del C.S. de la J.

4290210264033/JFN
COLO 5769 0301 42990

Calle 93B No. 12-48 P. 4 • Bogotá D.C., 110221 Colombia
Tel: (571) 601 9660 - 621 5810 • Fax: (571) 611 4209 - 635 1914
e-mail: tum@tumnet.com • Website: www.tumnet.com



TRIANA, URIBE & MICHELSEN

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de una planta de tabaco mutagenizada de alta capacidad de producción de semillas **caracterizada porque** produce una cantidad de semillas de por lo menos 4.000Kg por hectárea, a una densidad de siembre de por lo menos 125.000 plantas por hectárea, que comprende los siguientes pasos:
 - a) someter a mutagénesis las semillas producidas por los cruces iniciales entre los individuos de la misma especie pertenecientes al tipo silvestre o a variedades seleccionadas;
 - b) permitir que las semillas germinen y seleccionar las 5 plantas de las generaciones M2-M4 de acuerdo con los siguientes parámetros:
 - i. la presencia de una o más características fenotípicas manifiestas seleccionadas de: altura de planta 80-120 cm, hojas con una lámina delgada y en posición vertical, inflorescencia compacta, cantidad de flores superior a 100, cantidad de cápsulas superior a 100, cantidad de semillas por cápsula superior a 5.000, lignificados y tallo robusto, raíces profundas;
 - ii. estabilidad del carácter seleccionado en las generaciones siguientes a M2;
 - iii. verificación de la hereditariadad del carácter seleccionado;
 - c) permitir germinar las semillas seleccionadas en el paso b), y la regeneración de las plantas a partir de la hoja de mesófilo callo inducida in vitro ante la presencia de fitohormonas y la selección de las plantas que mantienen los caracteres seleccionados en el paso b) en las generaciones RO-R2;
 - d) sembrar en campo abierto las plantas seleccionadas en el paso c), y seleccionar también plantas que producen al menos 4.000Kg de semilla por hectárea, a una densidad de siembra de por lo menos 125.000 plantas por hectárea.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 donde el paso a) se sustituye por el paso:
 - a') producir semillas mutagenizadas mediante la modalidad de cruces

Calle 93B No. 12-48 P. 4 • Bogotá D.C., 110221 Colombia
Tel: (571) 601 9660 - 621 5810 • Fax: (571) 611 4209 - 635 1914
e-mail: tum@tumnet.com • Website:www.tumnet.com



interespecíficos dentro del género *Nicotiana*, seguido del cruce de los individuos F1 e inducción de anfiploide a través del tratamiento del ápice vegetativo de las plantas producido por dichos cruces con colchicina.

3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 que comprende también los siguientes pasos:
 - e) la transformación de las plantas obtenidas en el paso d) con vectores que incluyen casetes de expresión que expresan los genes de la planta para resistencia a enfermedades de insectos, herbicidas y/o hongos y la selección de las plantas así transformadas en las generaciones TO-T4 para resistencia a enfermedades de insectos, herbicidas y/o hongos y/o;
 - f) la transformación de las plantas obtenidas en el paso d) con uno o varios vectores que comprenden casetes de expresión que expresan los genes de semillas del metabolismo de ácidos grasos seguido de la selección de plantas transformadas en las generaciones TO-T4 por características tales como el contenido total de aceite de las semillas y la composición de ácidos grasos de las mismas;
 - g) cruce de las plantas obtenidas en las etapas e) y/o f), y la selección de la progenie resultante por una o más de las características seleccionadas en el grupo: de alta capacidad de producción de semillas en una cantidad superior a 4.000 Kg por hectárea, contenido de aceite de semillas mayor al 42 %, el título de yodo en el aceite obtenido de las semillas de la progenie inferior a 120, composición de ácidos grasos del aceite contenido en las semillas variable con respecto a la planta de tipo silvestre, la resistencia a insectos, resistencia a los herbicidas, la resistencia a los hongos.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicha cantidad de semilla es de aproximadamente 5000 kilogramos por hectárea, o de aproximadamente 7000 kilogramos por hectárea, o de aproximadamente 9000 kilogramos por hectárea a una densidad de siembra de aproximadamente 125.000 plantas por hectárea.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 en donde dicha planta se modifica adicionalmente en el metabolismo de ácidos grasos por transformación genética y produce una semilla que contiene un aceite que tiene un valor de yodo inferior o igual a 120.



6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 en donde dicha planta se modifica adicionalmente en el metabolismo de ácidos grasos por transformación genética y produce una semilla que contiene un porcentaje de aceite comprendido entre aproximadamente 40% a aproximadamente 60% de la semilla.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 en donde dicha planta se modifica en e) y / o g) por transformación con uno o más vectores de expresión que comprenden un casete de expresión específico de semilla que comprende, ordenados desde 5' a 3' una secuencia de ADN que codifica para un promotor de un gen específico de la planta para la expresión en órganos de almacenamiento de semillas; una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de señales de una proteína de la planta capaz de dirigir dicha proteína al retículo endoplasmático (ER); una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de señales capaz de dirigir la proteína al plástido o una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de señal capaz de anclar la proteína a la ER; una secuencia de ADN que codifica para una proteína seleccionada del grupo que comprende los genes la acetil-CoA carboxilasa (ACCase), aciltransferasa de diacil-glicerol (DGAT), lisofosfatidato aciltransferasa (LPAT), fosfatidato fosfohidrolasa (PAPase), proteína transportadora de acilo (ACP), malonil-CoA: ACP transacilasa, cetoacil-ACP sintasa (KAS), cetoacil-ACP reductasa, 3-hidroxiacil deshidrogenasa ACP, y noí I-ACP reductasa, Esteroil-desaturasa ACP, acil-tioesterasa ACP, glicerol-3-fosfatoaciltransferasa, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, citidina-5-difosfato sintasa diacilglicerol, sintasa glicerofosfato fosfatidil, fosfatidil glicerol-3-fosfato fosfatasa, FA O 1-8 desaturasa, fosfatasa de ácido fosfatídico, monogalactosil sintasa glicerol diacilo, digalactosil sintasa glicerol diacilo, proteínas de biosíntesis sulfolípida, sintasa acil-CoA de cadena larga, glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), diacilglicerol colina fosfotransferasa, sintasa de fosfatidilinositol, acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa, acil-ACP desaturasa, desaturasa lineoilo, desaturasa esfingolípidos, oleato 12-desaturasa, acetilenasa de ácidos grasos, epoxigenasa de ácido graso, diacilglicerol quinasa, colina fosfato citidil transferasa, colina quinasa, fosfolipasa, descarboxilasa fosfatidilserina, fosfatidilinositol quinasa, cetoacil-CoA sintasa, factor de transcripción CER, oleosina, 3-cetoacil-CoA tiolasa, acil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa, acil-CoA oxidasa, y una señal de poliadenilación.
8. Planta obtenible por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la producción de semillas para la fabricación de aceite de tabaco, aceites



combustibles, biodiesel, suplementos dietéticos para animales, combustibles sólidos, suplementos dietéticos humanos, lubricantes.

9. Planta obtenible por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la producción de biomasa para la conversión bioquímica o para la conversión termoquímica por combustión directa, carbonización, pirólisis, gasificación, digestión anaerobia, digestión aerobia, fermentación alcohólica o procedimientos de explosión de vapor.
10. Semilla de una planta obtenible por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la fabricación de aceite de tabaco, aceite combustible, biodiesel, suplementos dietéticos animales, combustibles sólidos, suplementos dietéticos humanos.
11. Un método para la extracción de aceite de las semillas de tabaco en el que el rendimiento de aceite se encuentra entre 15 el 70 y el 95% del aceite contenido en las semillas, que comprende los siguientes pasos:
 - a) la extracción del aceite mecánicamente presionando con la prensa helicoidal y la obtención de aceite y una torta de aceite residual;
 - b) la filtración del aceite extraído en el paso a) con filtros de papel o tela.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 que también comprende el paso:
 - c) extracción química por el uso de solventes del aceite residual contenido en la torta de aceite obtenida en el paso a).
13. El método de acuerdo con las reivindicaciones 11 ó 12 en el que el aceite se extrae de semillas, de la planta que se puede obtener por un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
14. El método de acuerdo con las reivindicaciones 12 ó 13 también comprende el paso:
 - d) refinado del aceite obtenido en las etapas a) o b), y c).
15. Biodiesel que comprende el aceite de semillas de la planta que se puede obtener por un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, transesterificado con metanol.



16. Suplemento alimenticio para uso humano que se caracteriza porque comprende aceite de semillas de la planta que se puede obtener por un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
17. Suplemento alimenticio para uso animal que comprende la torta de aceite obtenible en el paso a) de las reivindicaciones 11 ó 13 cuando dependen de la reivindicación 11.
18. Combustible sólido, que comprende la torta obtenible en el paso a) de las reivindicaciones 11 ó 13 cuando dependen, de la reivindicación 11.
19. Lubricante industrial que comprende el aceite de semillas de tabaco obtenibles a partir de cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 16.

ANEXO 1

Research Paper

Comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil

Ivana T. Stanisavljević¹, Dragan T. Veličković², Zoran B. Todorović¹, Miodrag L. Lazić¹ and Vlada B. Veljković¹¹ The Faculty of Technology, Leskovac, Serbia² Zdravlje-Actavis, Leskovac, Serbia

The yield and fatty acid (FA) composition of the oil obtained from the seeds of a semi-oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant, type Otija, by various recovery techniques, which are: Soxhlet extraction (SE), maceration (ME), indirect and direct ultrasonic extraction (IUE and DUE, respectively) and cold pressing (CP), were compared. The solvent extractions of ground tobacco seeds (TS) were carried out by *n*-hexane, while CP was used to recover the oil from the TS. The highest oil yield (32.9 g/100 g, i.e. 93% of the oil content in the seeds) was achieved by CP. Ultrasonically assisted solvent extractions appear to be inefficient in recovering the oil from the ground TS, as the oil yields were only 45–55% of the oil content, depending on the extraction conditions. Independently of the technique applied, linoleic acid was the major FA of the tobacco seed oil (TSO). The compositions of the TSO extracted by SE, ME, IUE and CP were very similar to each other, and the composition of the TSO recovered by DUE depended on the ultrasonic power input. The content of linoleic acid was reduced, while the content of saturated FA was increased by increasing the ultrasonic power from 5 to 50 W.

Keywords: Cold pressing / Extraction / Fatty acids / Seed oil / Tobacco

Received: October 14, 2008; accepted: December 22, 2008

DOI 10.1002/ejlt.200800232

1 Introduction

In the tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf production process, seeds are known as agricultural waste. By processing tobacco seeds (TS), two possibly valuable products can be produced: the oil and the cake. Tobacco cultivars give a good yield of oil, ranging up to 40% of the total seed mass, and the remaining part consists of crude fiber, protein, starch and inorganic material [1]. The main fatty acids (FA) of tobacco seed oil (TSO) are: palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids [2]. Trilinolein and palmitodilinolein are the main triacylglycerols accounting for about 90% of the composition of the oil [3]. TSO is free from nicotine and is comparable to other edible oils [4]. Because of the low proportion of saturated FA, which is desirable from a public health perspective, TSO can be considered as nutritionally appropriate, particularly com-

pared to high-saturated-fat vegetable oils. A drawback of TSO could be the high content of cholesterol [5]. Besides, TSO is shown to be a substitute for diesel fuel [6] or a feedstock for biodiesel production [7, 8]. On the other hand, the TS cake, a by-product in the oil extraction, is rich in nitrogen, predominantly in the form of amino acids (15.6%) [9], and could be incorporated into concentrate mixtures for dairy cattle feed, at up to about 25% of the ration [10]. In these ways, TSO represents a possible hope for the “healthy” use of tobacco and for the future of tobacco agriculture [11].

The procedures to extract oil from seeds are generally solvent extraction (SE) and pressing. So far, the Soxhlet extraction (SE) apparatus employing *n*-hexane [7, 12, 13] or diethyl ether [6] has been mainly used for TSO extraction under laboratory conditions. Maceration (ME) using petroleum ether and *n*-hexane has also been employed [2, 14]. Indirect ultrasonic extraction (IUE) has recently been used for extracting the oil from TS [11], but direct ultrasonic extraction (DUE) and cold pressing (CP) have not yet been used for recovering TSO. Despite several recovery techniques that have been used to obtain TSO, there is no comparative study on the influence of the recovery technique and

Correspondence: Ivana T. Stanisavljević, The Faculty of Technology, 124 Bulevar oslobođenja Street, 16000 Leskovac, Serbia.

E-mail: icaneca@gmail.com**Fax:** +381 16 242859

operating conditions on the yield and FA composition of TSO.

The present study deals with the yield and FA composition of the oils recovered from the seeds of a semi-oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant, type Otlja, by various recovery techniques, which are: SE, ME, IUE, DUE and CP. The solvent extractions of the oil from the ground TS were carried out by *n*-hexane, while CP was used to recover the oil from the TS. The main goals were to compare yields and compositions of the TSO obtained by various recovery techniques and to select the most favorable one. Special attention was paid to the effects of direct sonication on the extraction efficiency and composition of TSO.

2 Materials and methods

2.1 Materials

The seeds of a semi-oriental tobacco (*N. tabacum* L.) strain, type Otlja, were used. Moisture content, determined by drying at 105 °C to constant mass, was 5.5%. Before solvent extraction, the seeds were ground in an electrical mill with a fast-rotating knife (15,000 rpm; 1 min) to a fine powder which passed through the 0.63-mm screen. For one of the experiments, grinding was repeated five times, each time under the same conditions (15,000 rpm; 1 min). *n*-Hexane (Merck, Darmstadt, Germany) was used as the extracting solvent. The standard for methyl esters (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) contained methyl esters of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids (20% of each ester). Sodium methoxide (Merck) was used for preparing the methyl ester of the FA present in the TSO.

2.2 Oil extraction methods

2.2.1 Soxhlet extraction

The ground TS (10 g) and *n*-hexane (100 mL) were put into the Soxhlet apparatus. The solvent was boiled and refluxed in the extractor for a period of 90 min (six extraction cycles). Previously, we have found that the oil yield was not increased after the seventh cycle. The liquid extract was transferred to a rotary vacuum evaporator, and the solvent was evaporated at 50 °C to constant mass.

2.2.2 Maceration

ME was carried out at a seeds-to-solvent ratio of 1 : 3 g/mL at 25 °C (± 0.1 °C) for 20 min. The seeds-to-solvent ratio of 1 : 3 g/mL was used in all experiments because we have shown previously [2] that the oil yield obtained by ME was increased only by 6.8% when the seeds-to-solvent ratio was changed from 1 : 3 to 1 : 10 g/mL. The ground TS (5 g) were taken to an Erlenmeyer flask (100 mL) placed in a thermostated water

bath and *n*-hexane (15 mL) was added. Additional agitation or shaking was not employed. Exceptionally, in experiments where the effect of agitation on the extraction efficiency was estimated, 16.7 g of ground TS and 50 mL *n*-hexane were taken to a flask (100 mL) placed in the thermostated water bath. A propeller stirrer at minimum speed kept the seed particles suspended in the liquid. At the end of each extraction cycle, the liquid extract was separated from the solid residue by vacuum filtration. The seed cake was washed twice with fresh solvent (20 mL). The filtrates were collected and the solvent was evaporated in a rotary vacuum evaporator at 50 °C.

2.2.3 Indirect ultrasound extraction

IUE was carried out using an ultrasonic cleaning bath (Sonic, Niš, Serbia; total nominal power: 3 × 50 W; internal dimensions: 30 × 15 × 20 cm) operating at 40 kHz frequency. The bath was filled with distilled water up to one third of its volume (about 2.5 L). The temperature was controlled and maintained at 25 °C (± 0.1 °C) by water circulating from a thermostated bath by means of a pump. IUE was carried out at a seeds-to-solvent ratio of 1 : 3 g/mL and at 25 °C for 20 min. The extraction time has previously been optimized for this technique [11].

The ground TS (5 g) and *n*-hexane (15 mL) were taken to an Erlenmeyer flask (100 mL) placed in the ultrasonic bath and the suspension was sonicated for 20 min. Neither additional agitation nor shaking was employed, except in the experiment where ultrasound was combined with the action of a propeller stirrer keeping the seed particles (16.7 g) suspended in the solvent (50 mL). The further procedure to obtain the oil was the same as described in Section 2.3.

The ultrasonic power dissipated *via* the indirect sonication was measured by the calorimetric method, *i.e.* by determining the rate of the temperature increase due to conversion of the ultrasound energy into heat. The temperature in the extraction flask after switching on the ultrasonic generator was measured with a type-K thermocouple digital thermometer (Symmetry, Leskovac, Serbia). The dissipated ultrasonic power was measured separately from the extraction experiment under the same conditions (ultrasound bath, 40 kHz, seeds-to-solvent ratio of 1 : 3 g/mL, *n*-hexane) and was determined to be 2 W.

2.2.4 Direct ultrasonic extraction

The ground TS (50 g) and *n*-hexane (150 mL) were put into an ultrasonic reactor (URS 1000, ELAC, Nautic, Germany; internal diameter: 106 mm; height: 200 mm; total volume of the reactor: about 1.7 dm³) equipped with an ultrasonic transducer (frequency range: 40–2500 kHz; power range: up to 250 W). The transducer is a part of the reactor bottom (25 cm²). The ultrasonic power actually delivered to the extraction system by the ultrasonic generator was read out

from a digital display. The oil extraction was carried out at 25 °C applying a constant frequency of 1865 kHz and three different powers: 5, 10 and 50 W; the chosen frequency ensured a stable operation in the whole range of ultrasonic power. Previously, we showed that frequencies of sonication of up to 2250 kHz had no significant effect on the oil yield at a constant ultrasonic power (50 W), which was 19.4 ± 0.3 g/100 g. After 20 min of sonication without additional agitation, the liquid extract was separated from the solid residue by vacuum filtration. The seed cake was washed twice with fresh solvent (50 mL). The filtrates were collected and the solvent was evaporated in a rotary vacuum evaporator at 50 °C.

2.2.5 Cold pressing

The TS (1000 g) were pressed by a hydraulic press (Komet, Germany) through three nozzles (diameter of 15, 10 and 6 µm). The press does not involve mixing and tearing of the seeds.

The seed cake was ground by an electrical mill and the residual oil was extracted by using *n*-hexane at a seeds-to-solvent ratio of 1 : 3 g/mL and 25 °C for 60 min. The further procedure to obtain the oil was the same as described in Section 2.3.

2.3 Determination of TSO FA composition

The FA composition of TSO was determined by GC analysis after the FA had been transformed into methyl esters [2]. Methylation of the oil samples was carried out immediately after solvent evaporation from the extracts.

The methyl esters were stored in sealed dark-glass containers in a freezer until GC analysis. The methyl esters of TSO were analyzed using an Agilent 6850 gas chromatograph equipped with a DB WAX capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) and a flame ionization detector. The following temperature program was used: column, 50 °C, 1 min, 25 °C/min to 200 °C and 3 °C/min from 200 to 230 °C; injector, 250 °C; detector, 280 °C. Nitrogen, hydrogen and air at flow rates of 20, 30 and 400 mL/min, respectively, were used for the analysis. The volume of the oil injected was 0.2 µL. The methyl esters of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids were identified by comparison of retention times of the oil components with those of standard methyl esters. All experiments were done in duplicate.

3 Results and discussion

3.1 Yield of oil

The oil yields obtained from the TS by the different recovery techniques are compared in Table 1. As it can be seen, the oil yield depended on the type of the recovery technique and on the operating conditions applied. The highest oil yield (32.9 g/100 g) was achieved by CP of TS. After oil pressing, an additional amount of the residual oil (3.6% of the seed cake, or 2.4 g of the oil per 100 g of the initial TS) was extracted from the seed cake by using *n*-hexane. The sum of the oil yields obtained by CP followed by ME was accepted as the content of oil in the seeds (35.3 g/100 g).

SE gave the second highest oil yield among the techniques employed. The extraction efficiency of SE with respect to the

Table 1. Oil yields obtained by different recovery techniques.

Recovery technique	Seeds	Seeds-to-solvent ratio [§] [g/mL]	Duration of extraction [min]	Yield of oil [§] [g oil/100 g seeds]	
				25 °C	BT
Cold pressing (CP)	Not ground	–	–	32.9	–
Soxhlet extraction (SE)	Ground	1 : 10	90	–	31.1 [†]
Maceration (ME)	Ground	1 : 3	20	17.7	19.9 [†]
Indirect ultrasonic extraction (IUE), 2 W (0.134 W/g)	Ground	1 : 3	20	18.2	21.0 [‡]
Direct ultrasonic extraction (DUE)	Ground	1 : 3	20	16.2	–
				17.7	–
				19.4	–

[§] Extracting solvent: *n*-hexane.

[§] All experiments were carried out in duplicate.

[#] BT, boiling temperature.

[†] Enhanced temperature (close to the boiling temperature).

[‡] [2].

[‡] [11].

content of oil was 87.9%. This higher oil yield is a result of the greater seeds-to-solvent ratio and the prolonged extraction process. A higher oil yield by SE, compared to that obtained by IUE, was also obtained from ground rose hip seeds [15].

The yields of oil from the ground TS obtained by ME and IUE were substantially smaller than those achieved by CP and SE, being about 50% of the content of oil in the seeds. It might be speculated about the factors limiting the mass transfer of oil from the seed particles into the liquid extract, but the most important features were the solid particle size, the degree of cell destruction and the degree of macro-mixing. The low oil yield recovered by ME or IUE could be caused by the resistance to the mass transfer in the bulk of the liquid extract and/or the inefficient cell destruction. These assumptions were verified experimentally, as follows.

Firstly, the seeds were ground for 1 min and the oil extraction (seeds-to-solvent ratio of 1 : 3 g/mL, 25 °C, 60 min) was carried out with and without agitation and ultrasound. The oil yields obtained were as follows: ME 19.9 g/100 g; IUE 21.0 g/100 g; ME assisted by agitation 21.4 g/100 g; IUE assisted by agitation 21.8 g/100 g. This experiment showed that agitation improved the oil extraction from the ground seeds, increasing the oil yield recovered by both ME and IUE by about 10 and 4%, respectively. It can also be concluded that agitation was somewhat more effective than ultrasound in improving the extraction efficiency.

In the second experiment, the seeds were ground as previously, but grinding was repeated five times (1 min each time to avoid overheating of the seeds), and the oil extraction (seeds-to-solvent ratio of 1 : 3 g/mL, 25 °C, 60 min) was carried out with agitation. The oil yield was 33.9 g/100 g (about 96% of the oil content), which was higher than the one obtained by CP. Repeated grinding efficiently destroys the internal seed organs containing the oil, facilitating the release of oil from the interior of the seed particles. It will also decrease the size of the seed particles, reducing the resistance to oil diffusion from the interior of the seed particles to the bulk of the liquid extract. Both effects of repeated grinding improve the oil yield from the TS.

In the case of DUE, the increase of the ultrasound power from 5 to 50 W caused an increase of the oil yield by more than 20%. This was attributed to the greater specific ultrasonic power introduced to the extraction system (the ultrasonic power per gram of the suspension), as can be seen in Table 1. On the other hand, the increase in ultrasonic power from 60 to 170 W had no effect both on the yield and on the kinetics of the oil extraction from ground woad seeds [16]. Both the positive and negative effects of ultrasonic power were observed in the copper recovery from an oxide ore [17]. In this study, the leaching efficiency was improved with the rise in ultrasonic power, reaching a maximum value at a certain power, while it declined with a further increase in the ultrasonic power. Increased ultrasonic power resulted in more complete implosion of cavitation bubbles, creating more extreme final conditions. As a consequence, the mass

transfer from the solid particles was intensified and the solvent penetrated more easily into the solids, through the ultrasonic jets, which improved the extraction efficiency. The cavitation intensity could, however, not be increased without a limit, because de-coupling occurred between the ultrasonic transducer and the solution as the vibration amplitude increased, thus decreasing the ultrasonic energy transfer efficiency.

A higher oil yield from the TS was obtained by IUE at an ultrasonic power of 2 W (0.134 W/g) than by DUE at a power of 5 and 10 W (0.048 and 0.096 W/g, respectively), as can be seen in Table 1. The better extraction conditions in the former case were attributed to a higher specific ultrasound energy dissipation. However, higher yields of total saponin from various types of ginseng roots were obtained rather by direct than indirect sonication, due to the greater specific ultrasound energy introduced in the former extraction system (8.2 and 3.5 W per 15 mL of solvent and 200 mg of the plant material, respectively) [18].

The other available comparative studies of classical and ultrasonically assisted solvent extraction showed similar results with respect to the effects of indirect and direct sonication on the extraction efficiency. Vinatoru *et al.* improved the oil yield from crushed dill seeds in a substantially shorter time by ultrasound action, while the oil yields obtained by DUE and IUE were comparable [19]. Rostagno *et al.* determined that IUE could give an isoflavone extraction efficiency from soybeans similar to DUE [20]. Albu *et al.* showed that ultrasound increased the extraction efficiency of antioxidants from the herb rosemary, with comparable levels of extracted carnosic acid obtained by employing DUE and IUE [21]. However, the ultrasonic power actually delivered to the process systems was not given in these studies.

At enhanced temperature (close to the boiling temperature), the SE was the most effective technique in recovering the oil from the ground TS, ensuring an oil yield of 31.1 g/100 g, which was close to that obtained by CP. Comparable yields were obtained by ME and IUE at the boiling temperature (19.9 and 21.0 g/100 g, respectively). This result was attributed to the fact that seed comminution was more effective for the oil extraction than ultrasound action.

3.2 Fatty acid composition

The FA compositions of the TSO recovered from the ground TS by solvent extractions and that of the TSO obtained by CP of the TS are compared in Table 2. Independently of the recovery technique and the extraction conditions, the FA composition of TSO was dominated by linoleic acid, although the other major FA (palmitic, stearic, oleic and linolenic) were present. By comparing the FA compositions of the oils obtained by various recovery techniques with the published ones, one could conclude that only the FA compositions of the oils obtained by DUE at the ultrasonic power of 10 and 50 W differed from those of the oils recovered all

Table 2. The FA composition (%) of the TSO recovered by different techniques and operating conditions.

Fatty acid	Oil recovery technique [§]										
	Cold-pressed oil (CP)	Maceration (ME) [§]		Indirect ultrasonic extraction (IUE) [§]		Direct ultrasonic extraction (DUE) [§]		Soxhlet extraction (SE) [§]			
		25 °C	BT [†]	25 °C	BT	25 °C					
									Power [W]	Power [W]	
				2	5	10					50
Palmitic	9.10	8.50	8.52	8.26	8.40	10.71	12.23	13.99	8.42		
Stearic	3.27	2.77	4.72	3.66	5.32	3.49	4.33	4.91	3.78		
Oleic	13.74	12.49	14.72	12.17	14.89	13.02	15.09	16.66	11.78		
Linoleic	71.01	71.28	69.97	70.21	69.19	70.19	63.95	58.03	72.22		
Linolenic	0.70	0.93	1.06	0.89	1.12	0.81	0.78	0.71	0.84		
Others	2.18	4.03	1.01	4.81	1.08	1.78	3.62	5.70	2.96		
Saturated	12.37	11.27	13.24	11.92	13.72	14.20	16.56	18.90	12.20		
Unsaturated	85.45	84.7	85.75	83.27	85.2	84.02	79.82	75.40	84.84		
Monounsaturated	13.74	12.49	14.72	12.17	14.89	13.02	15.09	16.66	11.78		
Polyunsaturated	71.71	72.21	71.03	71.10	70.31	71.00	64.73	58.74	73.06		

[§] Operating conditions are given in Table 1.

[§] Extracting solvent: *n*-hexane.

[#] Enhanced temperature (close to the boiling temperature).

[†] BT, boiling temperature.

over the world. These differences included the greater content of palmitic acid and the smaller content of linoleic acid in the former case.

The total saturated (palmitic and stearic) and unsaturated (oleic, linoleic and linolenic) FA compositions of TSO recovered by SE, ME, IUE and CP were in the same ranges of 11–19% and 75–86%, respectively. However, the content of linoleic acid was reduced by about 12% when the ultrasonic power of direct sonication increased from 5 to 50 W (*i.e.* from 0.048 to 0.481 W/g). The total contents of saturated and unsaturated FA of TSO under the same conditions were increased by about 5% and decreased by about 10%, respectively. A small decrease in unsaturated FA and an increase in the content of saturated FA were observed in the case of soybean oil obtained by ultrasound-assisted extraction (specific ultrasonic power of 0.45–0.90 W/g) using *n*-hexane as extracting solvent, which was explained by the oxidation of unsaturated FA [22]. It was also observed that ultrasound (0.65 W/g) affected the FA composition of sunflower oil by decreasing the content of linoleic acid [23]. Because a slight increase in the conjugated diene values was detected as well, it was concluded that oxidation of the oil had occurred during sonication [23]. The ultrasonic oxidation of the oil was attributed to cavitation which affects structural and functional components up to the point of FA oxidation [24]. However, the decrease of unsaturated FA and the increase of saturated FA might mean that the reduction of the former FA occurred due to hydrogen generation under sonication of hydrocarbons. Indeed, Mizukoshi

et al. [25] reported that hydrogen was among the decomposition products of hydrocarbon (from decan to hexadecane) sonolysis under argon.

4 Conclusions

For obtaining oil from TS, several recovery techniques such as SE, ME, IUE, DUE and CP were compared with respect to both the extraction efficiency, measured by the oil yield, and the FA composition. The maximum oil yield of 35.3 g/100 g was obtained by a two-step process consisting of CP followed by ME. In this process, the seed cake after CP was ground and then the residual oil was extracted by using *n*-hexane. Among the individual techniques applied, CP was the most effective in recovering the oil from the TS, ensuring an oil yield of 93% of the maximum oil yield. This recovery technique is more acceptable than the other methods, not only for economic but also for environmental, health and safety reasons. The highest oil yield is obtained in a relatively simple technological process, producing no waste and using no potentially hazardous solvents.

ME and ultrasonic extraction are inefficient for recovering oil from the ground TS, as the oil yields were between 45 and 55% of the oil content in the seeds. The efficiency of these recovery techniques can be increased by a more effective comminution of the TS and by mechanical agitation of the extraction suspension. Repeated grinding of the TS followed

by ME assisted by mechanical agitation improved the oil extraction efficiency at 25 °C to up to 96% of the oil content in the seeds.

The major FA of the oil from the seeds of the tobacco plant, type Otlja, was linoleic acid (about 70%), although the other major FA (palmitic, stearic, oleic and linolenic acids) were also present. The compositions of the TSO extracted by SE, ME, IUE and CP were found to be similar to one another. However, the TSO recovered by DUE had a smaller content of linoleic acid compared to the other oils. When increasing the power of direct sonication, one can expect an increase in the saturated FA content and a decrease in the unsaturated FA content. The observed change of the FA profile by sonication has been explained so far only by oxidation of unsaturated FA. However, it may also be caused by reduction of the unsaturated FA induced by hydrogen generation under hydrocarbon sonolysis. Further investigations are needed to elucidate more clearly the mechanism of ultrasound action on the FA composition of oils.

Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Science and Ecology of the Republic of Serbia, projects MNT 142073b.

Conflict of interest statement

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] P. Udayasekhara Rao: Nutrient composition of some less-familiar oil seeds. *Food Chem.* 1994, 50, 379–382.
- [2] I. Stanisavljević, S. Lakićević, D. Veličković, M. Lazić, V. Veljković: The extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *CIG&CEQ* 2007, 13, 41–50.
- [3] M. A. Gofur, M. S. Rahman, G. M. Ahmed, A. Hossain, M. E. Haque: Studies on the characterisation and glyceride composition of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil. *Bangladesh J Sci Ind Res.* 1993, 28, 25–30.
- [4] J. A. Patel, B. K. Patel, M. K. Chakraborty: Production potential and quality aspects of tobacco seed oil. *Tobacco Res.* 1998, 24, 44–49.
- [5] W. Harris: *The Scientific Basis of Vegetarianism*. Hawaii Health Publishers, Honolulu, HI (USA) 1995.
- [6] N. Usta: Use of tobacco oil methyl ester in turbocharged indirect injection diesel engine. *Biomass Bioenergy.* 2005, 28, 77–86.
- [7] P. N. Giannelos, F. Zannikos, S. Stournas, E. Lois, G. Anastopoulos: Tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: Physical and chemical properties. *Ind Crop Prod.* 2002, 16, 1–9.
- [8] V. B. Veljković, S. H. Lakićević, O. S. Stamenković, Z. B. Todorović, M. L. Lazić: Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids. *Fuel.* 2006, 85, 2671–2675.
- [9] W. Ouyang, R. Xu, S. Du: Analysis and application of oriental tobacco seed. *Yancao Keji.* 2003, 12, 20–23.
- [10] S. K. Ranjhan: Use of agro-industrial by-products in feeding ruminants in India. *World Anim Rev.* 1978, 28, 31–37.
- [11] I. T. Stanisavljević, M. L. Lazić, V. B. Veljković: Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrason Sonochem.* 2007, 14, 646–652.
- [12] B. Eshetu: *Nicotiana tabacum* L. seed oil. www.ipp.boku.ac.at/pz/oilseeds/eshetu.html, 21. Feb. 2000, 24. Aug. 2005.
- [13] N. Frega, F. Bocci, L. S. Conte, F. Testa: Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.). *J Am Oil Chem Soc.* 1991, 68, 29–33.
- [14] H. Baydar, İ. Turgut: Variations of fatty acid composition according to some morphological and physiological properties and ecological regions in oilseed plants. *Türk J Agric For.* 1999, 23, 81–86.
- [15] K. Szentmihályi, P. Vinkler, B. Lakatos, V. Illés, M. Then: Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. *Bioresour Technol.* 2002, 82, 195–201.
- [16] M. Romdhane, C. Gourdon: Investigation in solid–liquid extraction: Influence of ultrasound. *Chem Eng J.* 2002, 87, 11–19.
- [17] K. M. Swamy, K. L. Narayana, V. N. Misra: Bioleaching with ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 2005, 12, 301–306.
- [18] J. Wu, L. Lin, F. Chau: Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason Sonochem.* 2001, 8, 347–352.
- [19] M. Vinatoru, T. Maricela, O. Radu, P. I. Filip, D. Lazurca, T. J. Mason: The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason Sonochem.* 1997, 4, 135–139.
- [20] M. A. Rostagno, M. Palma, C. G. Barroso: Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J Chromatogr.* 2003, 1012, 119–128.
- [21] S. Albu, E. Joyce, L. Panuwnyk, J. P. Lorimer, T. J. Mason: Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason Sonochem.* 2004, 11, 261–265.
- [22] H. Li, L. Pordesimo, J. Weiss: High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Res Int.* 2004, 37, 731–738.
- [23] F. Chemat, I. Grondin, A. Shum Cheong Sing, J. Smadja: Deterioration of edible oils during processing by ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 2004, 11, 13–15.
- [24] F. Chemat, I. Grondin, P. Costes, L. Moutoussamy, A. Shum Cheong Sing, J. Smadja: High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. *Ultrason Sonochem.* 2004, 11, 281–285.
- [25] Y. Mizukoshi, H. Nakamura, H. Bandow, Y. Naeda, Y. Nagata: Sonolysis of organic liquid: Effect of vapour pressure and evaporation rate. *Ultrason Sonochem.* 1999, 6, 203–209.

**Comparación de técnicas para la extracción de aceite de semillas de
tabaco**

**Ivana T. Stanisavljevic¹, Dragan T. Velckovic², Zoran B. Todorovic¹,
Miodrag L. Lazic¹ and Vlada B. Veljkovic¹**

¹ The Faculty of Technology, Leskovac, Serbia

² Zdravje-Actavis, Leskovac, Serbia

Se comparó el rendimiento y la composición de ácidos grasos (FA) del aceite obtenido de la semilla de una planta de tabaco semi-oriental (*Nicotiana tabacum* L.), tipo Otlja, mediante técnicas de recuperación serias, como son: Extracción Soxhelt (SE), maceración (ME), extracción ultrasónica directa e indirecta (IUE y DUE, respectivamente) y presión en frío (CP). La extracción de solventes de semillas molidas de tabaco (TS) se efectuó con n-hexano, en tanto que se utilizó la CP para recuperar el aceite de las TS. El mayor rendimiento de aceite (32,9 g/100 g, es decir, el 93% del contenido de aceite en las semillas) se logró mediante la CP. Las extracciones de solventes asistidas ultrasónicamente parecen ser ineficientes en la recuperación del aceite de las TS molidas, ya que los rendimientos de aceite fueron sólo del 45-55% del contenido de aceite, dependiendo de las condiciones de extracción. Independientemente de la técnica aplicada, el ácido linoléico fue el principal FA del aceite de semilla de tabaco (TSO). Las composiciones del TSO obtenidos mediante SE, ME, IUE y CP fueron muy similares entre sí, y la composición del TSO recuperado por DUE depende de la entrada de energía ultrasónica. Se redujo el contenido de ácido linoléico



contenido de FA saturados se incrementó al aumentar la energía ultrasónica de 5 a 50 W.

Palabras clave: *Presión en frío / Extracción / Ácidos grasos / Aceite de semilla / Tabaco*

Recibido: 14 de octubre de 2008; aceptado: 22 de diciembre de 2008

DOI 10.1002/ejlt.200800232

1. Introducción

En el proceso de producción de hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) las semillas son conocidas como residuos agrícolas. Mediante el procesamiento de semillas de tabaco (TS), se pueden producir dos productos posiblemente valiosos: el aceite y la torta. Los cultivos de tabaco dan un buen rendimiento de aceite, que va hasta el 40% de la masa total de semillas, y la parte restante se compone de fibra cruda, proteína, almidón y material inorgánico [1]. Los principales ácidos grasos (AG) de aceite de semillas de tabaco (TSO) son: ácidos palmítico, esteárico, oléico, linolénico y linoléico [2]. Trilinolein y palmitodilinolein son los principales triglicéridos, llegando a ser cerca del 90% de la composición del aceite [3]. El TSO es libre de nicotina y se compara con otros aceites comestibles [4]. Debido a la baja proporción de FA saturada, la cual es deseable desde una perspectiva de salud pública, el TSO puede considerarse nutricionalmente adecuado, especialmente en comparación con los aceites vegetales con alto contenido de grasas saturadas. Un inconveniente del TSO podría ser el alto contenido de colesterol [5]. Además, el TSO se muestra como un sustituto del combustible diesel [6] o una materia prima para la producción de biodiesel [7, 8]. Por otro lado, la torta de TS. Un



subproducto de la extracción de aceite, es rica en nitrógeno, predominantemente en forma de aminoácidos (15,6%) [9] y podría incorporarse en las mezclas de concentrados para la alimentación de ganado lechero, en hasta un 25% de la ración [10]. De esta forma, el TSO representa una posible esperanza para el uso "saludable" del tabaco y para el futuro de la agricultura del tabaco [11].

Los procedimientos para extraer aceite de las semillas son generalmente extracción de solventes (SE) y presión. Hasta ahora, el aparato de extracción Soxhlet (SE) que emplea n-hexano [7, 12, 13] o éter dietílico [6] se ha utilizado principalmente para la extracción del TSO bajo condiciones de laboratorio. También se ha empleado la maceración (ME) que usa el éter de petróleo y el n-hexano [2, 14]. La extracción ultrasónica indirecta (IUE) ha sido utilizada recientemente para extraer el aceite de las TS [11], pero la extracción ultrasónica directa (DUE) y la presión en frío (CP) no se ha utilizado todavía para la recuperación del TSO. A pesar de las distintas técnicas de recuperación que se han utilizado para obtener el TSO, no hay ningún estudio comparativo sobre la influencia de la técnica de recuperación y las condiciones de operación en el rendimiento y la composición de los FA del TSO.

El presente estudio se ocupa del rendimiento y la composición de FA de los aceites recuperados de las semillas de una planta de semi-oriental de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tipo Otlja, por medio de diversas técnicas de recuperación, las cuales son: SE, ME, IUE, DUE y CP. La extracción de solventes del aceite de las semillas de tabaco molidas se llevó a cabo por n-



hexano, mientras la CP fue utilizada para recuperar el aceite de las TS. Los principales objetivos fueron comparar rendimientos y composiciones del TSO obtenidos mediante diversas técnicas de recuperación y seleccionar la más favorable. Se prestó especial atención a los efectos de sonicación directa sobre la eficiencia de extracción y composición del TSO.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Se utilizaron semillas de una variedad de tabaco semi-oriental (N. tobacum L.), tipo Otlja. El contenido de humedad, determinado por secado a 105 °C a masa constante, fue de 5.5%. Antes de la extracción de solventes, las semillas se molieron en un molino eléctrico con un cuchillo de rotación rápida (15.000 rpm, 1 min) hasta lograr un polvo fino que pasa a través de la pantalla de 0.63 mm. Para uno de los experimentos, el proceso de molido se repitió cinco veces, cada vez en las mismas condiciones (15.000 rpm, 1 min). El n-hexano (Merck, Darmstadt, Alemania) fue utilizado como solvente de extracción. El estándar para ésteres metílicos (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, Estados Unidos) contiene ésteres metílicos de ácido palmítico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico (20% de cada éster). El metóxido de sodio (Merck) se utilizó para preparar el éster metílico de los FA presentes en el TSO.

2.2. Métodos de extracción de aceite

2.2.1. Extracción Soxhlet

Las semillas de tabaco molidas TS (10 g) y el n-hexano (100 ml) se colocaron en el aparato de Soxhlet. El solvente fue hervido y reñido en el



extractor durante un período de 90 min (seis ciclos de extracción). Anteriormente, encontramos que no se incrementó el rendimiento del aceite después del séptimo ciclo. El extracto líquido fue trasladado a un evaporador rotatorio de vacío, y se evaporó el disolvente a 50 °C a masa constante.

2.2.2. Maceración

La ME se llevó a cabo en una proporción de semillas- solvente de 1:3 g/mL a 25 °C ($\pm 0,1$ °C) durante 20 minutos. Se utilizó la proporción de semillas- solvente de 1:3 g/mL en todos los experimentos porque hemos demostrado anteriormente [2] que el rendimiento del aceite obtenido por la ME aumentó sólo un 6.8% cuando la proporción de semillas-solvente se cambió de 1:3 a 1:10 g/mL. Las TS molidas (5 g) fueron llevadas a un matraz Erlenmeyer (100 mL) en un baño de agua de termostato y se agregó n-hexano (15 mL). No se usó agitación adicional. Excepcionalmente, en experimentos donde se estimó el efecto de la agitación sobre la eficiencia de extracción, se llevaron 16.7 g de TS molidas y 50 mL de n-hexano a un matraz (100 mL) colocado en el baño de agua de termostato. Un agitador de hélice a velocidad mínima mantuvo las partículas de semillas suspendidas en el líquido. Al final de cada ciclo de extracción, el extracto líquido se separó del residuo sólido por filtración de vacío. La torta de semillas se lavó dos veces con solvente fresco (20 mL). Se recogieron los filtrados y el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio de vacío a 50 °C.

2.2.3. Extracción ultrasónica indirecta

La IUE se llevó a cabo utilizando un baño de limpieza ultrasónica (Sono Nis, Serbia; potencia total nominal: 3 x 50 W; dimensiones internas 100x15x20 cm).



funcionando a la frecuencia de 40 kHz. El baño fue llenado con agua destilada hasta un tercio de su volumen (aproximadamente 2,5 L). La temperatura fue controlada y mantenida a 25 °C ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) por agua circulando desde un baño termostatzado por medio de una bomba. La IUE se llevó a cabo en una proporción de semillas-solvente de 1:3 g/mL y a 25 °C durante 20 minutos. Previamente, el tiempo de extracción ha sido optimizado para esta técnica [11].

Las TS molidas (5 g) y el n-hexano (15 mL) fueron llevados a un matraz Erlenmeyer, colocado en el baño ultrasónico y la suspensión fue sonicada durante 20 minutos. No se empleó agitación ni sacudida adicional, excepto en el experimento donde el ultrasonido se combinó con la acción de un agitador de hélice, manteniendo las partículas de semillas (16.7 g) suspendidas en el solvente (50 mL). El posterior procedimiento para obtener el aceite fue el mismo descrito en la Sección 2.3.

La potencia disipada por ultrasonido a través de la sonicación indirecta se midió por el método calorimétrico, es decir, mediante la determinación de la tasa del aumento de temperatura debido a la conversión de la energía de ultrasonido en calor. La temperatura en el matraz de extracción después de encender el generador de ultrasónico se midió con un termómetro digital de termopar tipo K (Symmetry, Leskovac, Serbia). La potencia disipada por ultrasonido se midió por separado del experimento de extracción bajo las mismas condiciones (baño de ultrasonido, 40 kHz, proporción semillas-solvente de 1:3 g/mL, n-hexano) y estaba determinada a ser

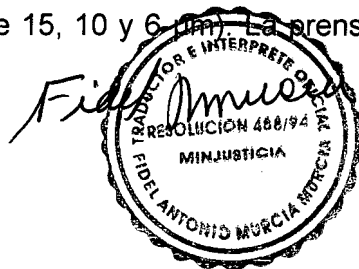


2.2.4. Extracción ultrasónica directa

Las TS molidas (50 g) y el n-hexano (150 mL) se colocaron en un reactor ultrasónico (URS 1000, ELAC, Nautic, Alemania; diámetro interno: 106 mm, altura: 200 mm, el volumen total del reactor: aproximadamente 1.7 dm³) equipado con un transductor ultrasónico (rango de frecuencia: 40-2500 kHz; rango de potencia: hasta 250 W). El transductor es una parte de la parte inferior del reactor (25 cm²). La energía ultrasónica realmente entregada al sistema de extracción por el generador de ultrasonidos se leyó de una pantalla digital. La extracción de aceite se llevó a cabo a 25 °C aplicando una frecuencia constante de 1865 kHz y tres potencias diferentes: 5, 10 y 50W; la frecuencia escogida garantiza una operación estable en toda la gama de potencias ultrasónicas. Anteriormente, hemos demostrado que las frecuencias de sonicación de hasta 2250 kHz no tuvieron efectos significativos en el rendimiento de aceite en una potencia ultrasónica constante (50 W), la cual fue de 19.4 ± 0.3 g/100 g. Después de 20 minutos de sonicación sin agitación adicional, el extracto líquido se separó del residuo sólido por filtración de vacío. La torta de semilla se lavó dos veces con solvente fresco (50 mL). Se recogieron los filtrados y el disolvente se evaporó en un evaporador rotatorio de vacío a 50 °C.

2.2.5. Presión en frío

Las TS (1000 g) fueron presionadas por una prensa hidráulica (Komet, Alemania) a través de tres boquillas (diámetro de 15, 10 y 6 mm). La prensa no implica mezcla y rasgado de las semillas.



La torta de semilla fue molida por un molino eléctrico y el aceite residual se extrajo usando n-hexano en una proporción de semillas-solvente de 1:3 g/mL y 25 °C durante 60 minutos. El posterior procedimiento para obtener el aceite fue el mismo descrito en la Sección 2.3.

2.3. Determinación de la composición de FA del TSO

La composición de FA del TSO se determinó por análisis de GC después de que los FA se habían transformado en ésteres metílicos [2]. La metilación de las muestras de aceite se llevó a cabo inmediatamente después de la evaporación del solvente de los extractos.

Los ésteres de metilo fueron almacenados en envases sellados de vidrio oscuro en un congelador hasta el análisis de GC. Los ésteres de metilo del TSO fueron analizados usando un cromatógrafo de gases Agilent 6850 equipado con una columna capilar DB WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) y un detector de ionización de llama. Se utilizó el siguiente programa de temperatura: columna, 50 °C, 1 min, 25 °C/min a 200 °C y 3 °C/min, de 200 a 230 °C; inyector, 250 °C; detector, 280 °C. Se utilizó para el análisis nitrógeno, hidrógeno y aire a velocidades de flujo de 20, 30 y 400 mL/min, respectivamente. El volumen del aceite inyectado fue de 0.2 µL. Se identificaron los ésteres de metilo de los ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico mediante la comparación de los tiempos de retención de los componentes de aceite con los de los estándares de ésteres metílicos. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.



3. Resultados y Discusión

3.1 Rendimiento del aceite

Los rendimientos de aceite obtenidos de las hojas de tabaco mediante las diferentes técnicas de recuperación se comparan en la Tabla 1. Como puede verse, el rendimiento del aceite depende del tipo de técnica de recuperación y de las condiciones de operación aplicadas. El rendimiento más alto del aceite (32,9 g/100 g) fue obtenido mediante la CP de las TS. Después de presionar el aceite, se extrajo una cantidad adicional de aceite residual (3.6% de la torta de semillas, o 2.4 g de aceite por cada 100 g de las TS iniciales) de la torta de semillas mediante el uso de n-hexano. La suma de los rendimientos de aceite obtenidos por la CP seguida de la ME fue aceptada como el contenido de aceite en las semillas (35.3 g/100 g).

Tabla 1. Rendimiento de aceite obtenido por diferentes técnicas de recuperación

Técnica de recuperación	Semillas	Relación Semillas a Solvente ^ξ [g/mL]	Duración de la Extracción [min]	Producción de Aceite [§] [g aceite/100 g semillas]	
				25°C	BT
Presión en Frío (CP)	No Molidas	-	-	32.9	-
Extracción Soxhlet (SE)	Molidas	1:10	90	-	31.1 [‡]
Maceración (ME)	Molidas	1:3	20	17.7	19.9 [†]
Extracción Ultrasónica Indirecta (IUE), 2W (0.134 W/g)	Molidas	1:3	20	18.2	21.0 [*]
Extracción Ultrasónica Directa (DUE) 5W (0.048 W/g) 10W (0.096 W/g) 50W (0.481 W/g)	Molidas	1:3	20	16.2	-
				17.7	-
				19.4	-

ξ Extracción de Solventes: n-hexano
§ Se realizaron todos los experimentos en duplicado
BT, temperatura de ebullición.
‡ Temperatura mejorada (cercana a la temperatura de ebullición)
† [2]
* [11]

La SE produjo el segundo mayor rendimiento de aceite entre las técnicas empleadas. La eficiencia de extracción de la SE con respecto al contenido de aceite fue de 87.9%. Este mayor rendimiento de aceite es el resultado de la



mayor proporción de semillas-solvente y el proceso de extracción prolongado. Un mayor rendimiento de aceite por SE, comparado con los obtenidos mediante IUE, también fue obtenido de semillas molidas de rosa mosqueta [15].

Los rendimientos de aceite de las TS molidas obtenidas por ME e IUE fueron muy inferiores a los alcanzados por la CP y SE, siendo aproximadamente el 50% del contenido de aceite en las semillas. Se podría especular sobre los factores que limitan la transferencia de masa de aceite de las partículas de semillas en el extracto líquido, pero las características más importantes fueron el tamaño de partícula sólida, el grado de destrucción de la célula y el grado de mezclado-macro. El bajo rendimiento del aceite recuperado por ME o IUE podría ser causado por la resistencia a la transferencia de masa en la mayor parte de extracto líquido y/o la destrucción ineficiente de células. Estos supuestos fueron verificados experimentalmente, como sigue.

En primer lugar, las semillas fueron molidas durante 1 minuto y se llevó a cabo la extracción del aceite (proporción de semillas-solvente de 1:3 g/mL, 25 °C, 60 min) con y sin agitación y ultrasonido. Los rendimientos de aceite obtenidos fueron los siguientes: ME 19.9 g/100 g; IUE 21.0 g/100 g; ME asistida por agitación 21.4 g/100 g; IUE asistida por agitación 21.8 g/100 g. Este experimento demostró que la agitación mejoró la extracción de aceite de las semillas molidas, aumentando el rendimiento del aceite recuperado mediante ME e IUE alrededor del 10 y 4%, respectivamente. También se



puede concluir que la agitación fue algo más eficaz que el ultrasonido en la mejora de la eficiencia de extracción.

En el segundo experimento, las semillas fueron molidas como en el caso anterior, pero el proceso de molido se repitió cinco veces (1 min cada vez para evitar el sobrecalentamiento de las semillas), y la extracción del aceite (proporción de semillas-solvente de 1:3 g/mL, 25 °C, 60 min) se llevó a cabo con agitación. El rendimiento del aceite fue 33.9 g/100 g (aproximadamente el 96% del contenido de aceite), el cual fue superior al obtenida mediante la CP. El proceso de molido repetido destruye eficientemente los órganos internos de la semilla que contiene el aceite, facilitando la liberación de aceite del interior de las partículas de semillas. También disminuye el tamaño de las partículas de semillas, reduciendo la resistencia a la difusión de aceite desde el interior de las partículas de semillas para la mayor parte del extracto líquido. Ambos efectos del proceso de molido repetido mejoran el rendimiento del aceite de las TS.

En el caso de la DUE, el aumento de la potencia de ultrasonido de 5 a 50 W provocó un incremento del rendimiento del aceite por más de 20%. Esto se atribuyó a la mayor potencia de ultrasonido específica introducida en el sistema de extracción (la potencia ultrasónica por gramo de la suspensión), como puede verse en la Tabla 1. Por otro lado, el aumento de la potencia ultrasónica de 60 a 170 W no tuvo efecto sobre el rendimiento y en la cinética de la extracción de aceite de semillas molidas de hierba *Pastelillo* [16]. Los efectos positivos y negativos de la potencia ultrasónica se observaron en la



recuperación de cobre de un mineral de óxido [17]. En este estudio, se mejoró la eficiencia del filtrado con el aumento de la potencia ultrasónica, alcanzando un valor máximo a cierta potencia, mientras que se redujo con el aumento en la potencia ultrasónica. El aumento de la potencia ultrasónica resultó en una implosión más completa de burbujas de cavitación, creando condiciones finales más extremas. Como consecuencia, la transferencia de masa de las partículas sólidas se intensificó y el solvente penetró más fácilmente en los sólidos, a través de los chorros de ultrasonidos, que mejoraron la eficiencia de la extracción. Sin embargo, la intensidad de cavitación no podría ser aumentada sin un límite, porque la disociación se produjo entre el transductor ultrasónico y la solución como la amplitud de vibración aumentada, disminuyendo así la eficiencia de transferencia de energía ultrasónica.

Se obtuvo un mayor rendimiento de aceite de las TS por medio de la IUE en una potencia ultrasónica de 2 W (0.134 W/g) que mediante la DUE a una potencia de 5 y 10 W (0.048 y 0.096 W/g, respectivamente), como puede verse en la Tabla 1. Las mejores condiciones de extracción en el primer caso fueron atribuidas a una mayor disipación de energía específica de ultrasonido.

Sin embargo, los rendimientos más altos de saponina total de varios tipos de raíces de ginseng se obtuvieron mejor por sonicación directa que indirecta, debido a la mayor energía específica de ultrasonido introducida en el primer sistema de extracción (8.2 y 3.5 W por 15 mL de solvente, 1.200 y 0.600 g de material vegetal, respectivamente) [18].



Los otros estudios comparativos disponibles de extracción de solventes clásica y asistida por ultrasonido mostraron resultados similares con respecto a los efectos de sonicación directa e indirecta sobre la eficiencia de extracción. Vinatoru et al. mejoró el rendimiento del aceite de semillas de eneldo picadas en un tiempo sustancialmente más corto por acción del ultrasonido, mientras los rendimientos del aceite obtenido mediante DUE e IUE fueron comparables [19]. Rostagno et al. determinó que el IUE podría dar una eficiencia de extracción isoflavona de los granos de soya similares a DUE [20]. Albu et al demostró que el ultrasonido aumentó la eficiencia de extracción de antioxidantes del romero, con niveles comparables de ácido carnósico extraído obtenidos empleando DUE e IUE [21]. Sin embargo, la energía ultrasónica realmente entregada a los sistemas de proceso no se dio en estos estudios.

A mayor temperatura (cerca a la temperatura de ebullición), la SE fue la técnica más eficaz en la recuperación del aceite de las TS molidas, garantizando un rendimiento de aceite de 31.1 g/100 g, la cual estaba cerca de los obtenidos por la CP. Se obtuvieron rendimientos comparables mediante DUE e IUE en la temperatura de ebullición (19.9 y 21.0 g/100 g, respectivamente). Este resultado se atribuyó al hecho de que pulverización de semilla era más eficaz para la extracción del aceite que la acción del ultrasonido.

3.2 Composición de ácidos grasos



Las composiciones de FA del TSO recuperado de las TS molidas por extracción de solventes y el TSO obtenido por CP de las TS se comparan en la Tabla 2. Independientemente de la técnica de recuperación y las condiciones de extracción, la composición de FA del TSO fue dominada por el ácido linoléico, aunque estuvieron presentes los otros principales FA (palmítico, esteárico, oleico y linoléico). Comparando las composiciones de FA de los aceites obtenidos por diversas técnicas de recuperación con los publicados, se podría concluir que sólo las composiciones de FA de los aceites obtenidos por DUE a la potencia ultrasónica de 10 y 50 W difieren de las de los aceites recuperados en todo el mundo. Estas diferencias incluyen mayor contenido de ácido palmítico y menor contenido de ácido linoléico en el primer caso.

Tabla 2. Composición FA (%) de la TSO recuperada por diferentes técnicas y condiciones de operación.

Ácido Graso	Técnica de Recuperación de Aceite [§]								
	Aceite prensado en frío (CP)	Maceración (ME) [§]		Extracción Ultrasónica Indirecta (IUE) _s		Extracción Ultrasónica Directa (DUE) [§]			Extracción Soxhlet (SE) [§]
				25°C	BT	25°C			
				Potencia [W]		Potencia [W]			
		2	5	10	50				
Palmítico	9.10	8.50	8.52	8.26	8.40	10.71	12.23	13.99	8.42
Esteárico	3.27	2.77	4.72	3.66	5.32	3.49	4.33	4.91	3.78
Oléico	13.74	12.49	14.72	12.17	14.89	13.02	15.09	16.66	11.78
Linoléico	71.01	71.28	69.97	70.21	69.19	70.19	63.95	58.03	72.22
Linolénico	0.70	0.93	1.06	0.89	1.12	0.81	0.78	0.71	0.84
Otros	2.18	4.03	1.01	4.81	1.08	1.78	3.62	5.70	2.96
Saturado	12.37	11.27	13.24	11.92	13.72	14.20	16.56	18.90	12.20
Insaturado	85.45	84.7	85.75	83.27	85.2	84.02	79.82	75.40	84.84
Mono- saturado	13.74	12.49	14.72	12.17	14.89	13.02	15.09	16.66	11.78
Poli-insaturado	71.71	72.21	71.03	71.10	70.31	71.00	64.73	58.74	73.06

[§] Las condiciones de operación se dan en la Tabla 1
[§] Extracción de solventes: *n*-hexano
[§] Temperatura mejorada (cercana a la temperatura de ebullición)
[§]BT, temperatura de ebullición.

Las composiciones totales de FA saturados (palmítico, esteárico) e insaturados (oléico, linoléico y linolénico) del TSO recuperado por SE, ME



IUE y CP estuvieron en los mismos rangos de 11-19 y 75-86%, respectivamente. Sin embargo, el contenido de ácido linoléico se redujo en un 12% cuando la potencia ultrasónica de sonicación directa aumentó de 5 a 50 W (es decir, de 0.048 0.481 W/g). El contenido total de FA saturados e insaturados del TSO en las mismas condiciones se incrementó en aproximadamente 5% y disminuyó en un 10%, respectivamente. Se observó una pequeña disminución en los FA insaturados y un aumento en el contenido de FA saturados en el caso del aceite de soya obtenido por extracción asistida por ultrasonido (potencia ultrasónica específica de 0.45-0.90 W/g) con n-hexano como solvente de extracción, lo cual se explicó por la oxidación de FA insaturados [22]. También se observó que el ultrasonido (0.65 W/g) afectó la composición de los FA del aceite de girasol al disminuir el contenido de ácido linoléico [23]. Debido a que se detectó un ligero incremento en los valores de dieno conjugado, se concluyó que la oxidación del aceite había ocurrido durante la sonicación [23]. La oxidación ultrasónica del aceite se atribuyó a la cavitación, la cual afecta los componentes estructurales y funcionales hasta el punto de la oxidación de los FA [24]. Sin embargo, la disminución de los FA insaturados y el aumento de los FA saturados podría significar la reducción de los primeros FA producidos debido a la generación de hidrógeno bajo sonicación de hidrocarburos. De hecho, Mizukoshi et. al. [25] informó que el hidrógeno estaba dentro de los productos de descomposición de la sonolisis de hidrocarburos (del decanato a Hexadecano) bajo argón.



4. Conclusiones

Para obtener aceite de las TS, se compararon diferentes técnicas de recuperación tales como SE, ME, IUE, DUE e CP con relación a la eficiencia de extracción, medida por el rendimiento del aceite y la composición de los FA. El rendimiento máximo del aceite de 35.3 g g/100 fue obtenido por un proceso de dos pasos que incluye la CP seguida por la ME. En este proceso, la torta de semillas después de la CP fue molida y luego se extrajo el aceite residual mediante el uso de n-hexano. Entre las técnicas individuales aplicadas, la CP fue la más efectiva en la recuperación del aceite de las TS, garantizando un rendimiento de aceite del 93% del rendimiento máximo de aceite. Esta técnica de recuperación es más aceptable que los otros métodos, no sólo por razones económicas sino también ambientales, de salud y de seguridad. El mayor rendimiento de aceite se obtiene en un proceso tecnológico relativamente simple, que no produce residuos y no usa solventes potencialmente peligrosos.

La ME y la extracción ultrasónica son ineficientes para recuperar el aceite de las TS molidas, ya que los rendimientos de aceite estuvieron entre el 45 y 55% del contenido de aceite en las semillas. La eficiencia de estas técnicas de recuperación se puede incrementar mediante una combinación más eficaz de las TS y mediante la agitación mecánica de la suspensión de la extracción. El proceso de molido repetido de las TS seguido de la ME asistida por agitación mecánica mejoró la eficiencia de extracción de aceite a 25 °C hasta un 96% del contenido de aceite en las semillas.



Los principales FA del aceite de las semillas de la planta de tabaco, tipo Otlja, fue el ácido linoléico (70%), aunque también estuvieron presentes los otros principales FA (ácidos palmítico, esteárico, oléico y linoléico). Las composiciones del TSO obtenido por SE, ME, IUE y CP resultaron para ser similares entre sí. Sin embargo, el TSO recuperado por DUE tuvo un menor contenido de ácido linoléico en comparación con los otros aceites. Al aumentar la potencia de sonicación directa, se podría esperar un aumento en el contenido de FA saturado y una disminución en el contenido de FA insaturados. El cambio observado del perfil FA por sonicación ha sido explicado hasta el momento sólo por la oxidación de FA insaturados. Sin embargo, también este podría ser causado por la reducción de los FA insaturados inducidos por la generación de hidrógeno bajo la sonolisis de hidrocarburos. Se necesitan nuevas investigaciones para dilucidar más claramente el mecanismo de la acción del ultrasonido sobre la composición de FA de aceites.

Reconocimientos

Este trabajo fue apoyado por el Ministerio de Ciencia y Ecología de la República de Serbia, proyectos MNT 142073b.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores no han declarado ningún conflicto de interés.

Referencias

- [1] P. Udayasekhara Rao: Composición de nutrientes de algunas semillas de aceite menos conocidas. Food chem, 1994, 50, 379-382



- [2] I. Stanisavljevic, S. Lakicevic, D. Velickovic, M. Lazic, V. Veljkovic. La Extracción del aceite de las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). CIECEQ 2007, 13, 41-50.
- [3] M.A. Gofur, M.S. Rahman, G.M. Ahmed, A. Hossain, M.E. Haque: Estudios sobre la caracterización y composición de glicéridos del aceite de semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Bangladesh J Sei Ind Res, 1993, 28, 25-30.
- [4] J.A. Patel, B.K. Patel, M.K. Chakraborty: Aspectos potenciales y de calidad de la producción del aceite de semillas de tabaco. Tobacco Res. 1998, 24, 44-49.
- [5] W. Harris: Las Bases Científicas del Vegetarianismo. Hawaii Health Publishers, Honolulu, HI (Estados Unidos) 1995.
- [6] N. Usta: Uso del ester metil del aceite de tabaco en el motor diesel de inyección indirecta turbo. Biomass Bioenergy, 2005, 28, 77-86.
- [7] P.N. Giannelos, F. Zannikos, s. Stournas, e. Lois, G. Anastopoulos: Aceite de semillas de tabaco como una alternative de combustible diesel: propiedades físicas y químicas. Ind Crop Prod. 2002, 16, 1-9.
- [8] V.B. Veljkovic , S.H. Lakicevic, O.S. Stamenkovic, Z.B. Todorovic, m.I. Lazic: producción biodiesel del aceite de semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con un alto contenido de ácidos libres de grasas. Fuel. 2006, 85, 2671-2675.
- [9] W. Ouyang, R. Xu, S. Du: Análisis y aplicación de las semillas del tabaco oriental. Yancoo Keji. 2003, 12, 20-23.
- [10] S.K. Ranjhan: Uso de los subproductos agroindustriales en la alimentación de rumiantes en India. World anim Rev. 1978, 28, 13-33.



- [11] I.T. Stanisavljevic, M. L. Lazic, V.B. Veljkovic: Extracción ultrasonica del aceite de las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). *Ultrason Sonochem* 2007, 14, 646-652.
- [12] B. Eshetu: aceite de semillas de *Nicotiana tabacum* L. www.ipp.boku.ac.at/pz/oilseeds/eshetu.html , 21 Feb. 2000, 24, Agosto 2005.
- [13] N Frega, F. Bocci, L.S. conte, F. Testa: Composición química de las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). *J Am Oil Chem Soc.* 1991, 68, 29-33.
- [14] H. Baydar, I. turgut: Variaciones de la composición de ácidos grasos de acuerdo a algunas propiedades morfológicas y fisiológicas y regiones ecológicas en plantas de semillas de tabaco. *Turk J Agric For*, 1999, 23, 81-86.
- [15] K. Szentmihalyi, P. Vinker, B. Lakatos, V. Illés, M. Then: Aceite de rosa mosqueta (*Rosa canina* L.) obtenido de los residuos de semillas de rosa mosqueta mediante diferentes métodos de extracción. *Bioresour Technol.* 2002, 82, 195-201.
- [16] M. Romdhane, C. Gourdon: Investigación sobre extracción sólidos-líquidos: Influencia del ultrasonido. *Chem Eng J.* 2002, 87, 11-19.
- [17] K. M. Swamy, K.L. Narayana, V.N. Misra: biolixiviación con ultrasonido. *Ultrason Sonochem.* 2005, 12, 301-306.
- [18] J. Wu, L. Lin, F. Chau: Extracción asistida por ultrasonido de saponinas de ginseng de raíces de ginseng y células de ginseng cultivadas. *Ultrason Sonochem.* 2001, 8, 347-352.



- [19] M. Vinatoru, T. Maricela, O. Radu, P.I. Filip, D. Lazurca, T. J. Manson: el uso del ultrasonido para la extracción de principios bioactivos de materiales de planta. *Ultrason Sonochem.* 1997, 4, 135-139.
- [20] M. A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso: Extracción asistida por ultrasonido de isoflavones de soya. *J Chromatogr.* 2003, 1012, 119-128.
- [21] S. Albu, e. Joyce, L. Panuwnyk, J.P. Lorimer, T.J. Mason: Potencial para el uso del ultrasonido en la extracción de antioxidantes del *Rosmarinus officinalis* para la industria de alimentos y farmacéutica. *Ultrason Sonochem.* 2004, 11, 261-265.
- [22] H. Li, L. Pordesimo, J. Weiss: Extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad del aceite de soya. *Food Res Int.* 2004, 37, 731-738.
- [23] F. Chemat, I. Grondin, a. Shum Cheong Sing, J. Smadja: Deterioro de aceites comestibles durante el procesamiento por ultrasonido. *Ultrason Sonochem.* 2004, 11, 13-15.
- [24] F. Chemat, I. Grondin, P. Costes, I. Moutoussamy, A. Shum Cheong sing, J. Smadja: Efectos del ultrasonido de alta potencia sobre la oxidación de lípidos del aceite de girasol refinado. *Ultrason Sonochem.* 2004, 11, 281-285.
- [25] Y. Mizukoshi, H. Nakamura, h. Bandow, Y. Naeda, Y. Nagata: Sonolisis Del líquido orgânico: efecto de la presión de vapor y la tasa de evaporación. *Ultrason Sonochem.* 1999, 6, 203-209.



ANEXO 2

Rapporto di prova n°: **11LA01742**

Committente

SUNCHEM SRL

VIA DEL PARCO TECNOLOGICO, 6
26041 CASALMAGGIORE CR

Dati del campione

Data accettazione: **12/04/2011**

Data inizio prove: **12/04/2011**

Data fine prove: **22/04/2011**

Data emissione: **05/05/2011**

Descrizione: **OLIO DI SEMI**

Etichetta: **CAMP. 2 - 10/4/11**

Imballaggio: **contenitore di PE**

Sigilli: **assenti**

Campionamento eseguito da: **Cliente**

Prova Metodo	Unità di misura	Risultato
• Cere (36-46 atomi di carbonio)	mg/Kg	64,5
• TRIACILGLICEROLI CLASSI ECN (HPLC) Metodo Interno		
• ECN40	%	1,66
• ECN42	%	45,38
• ECN44	%	33,20
• ECN46	%	15,49
• ECN48	%	3,62
• ECN50	%	0,60
• ECN52	%	0,06
• ACIDI GRASSI OSSIDATI TOTALI NGD C88-2007	%	2,13
• Acidi Grassi Ossidati (Idrossi, Idroperossi C18:1, C18:2, C18:3, Cheto C18:1)	%	0,73
• Acidi Grassi Ossidati (Cheto C18:2, C18:3)	%	1,40
ESTERI METILICI DEGLI ACIDI GRASSI ISO 5508:1990 + ISO 12966-2:2011		
Acido miristico	%	0,03
Acido pentadecanoico	%	0,02
Acido palmitico	%	8,12
Acido palmitoleico	%	0,12
Acido eptadecanoico	%	0,10
Acido eptadecenoico	%	0,04
Acido stearico	%	2,78
Acido oleico	%	11,68
Acido linoleico	%	75,89
Acido linolenico	%	0,81
Acido octadecatetraenoico	%	0,02
Acido arachico	%	0,16
Acido eicosenoico	%	0,10
Acido beenico	%	0,08
Acido erucico	%	0,02
Acido lignocericico	%	0,03

*Il risultato delle prove si riferisce soltanto al campione ricevuto, e non al lotto che il campione rappresenta.
I campioni si conservano per tre mesi dalla data di fatturazione.
La riproduzione parziale del presente rapporto di prova non è ammessa, salvo autorizzazione scritta della Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.*

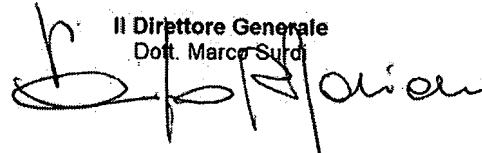
Segue rapporto di prova n°: 11LA01742

Prova Metodo	Unità di misura	Risultato
STEROLI		
NGD C71-1989		
Colesterolo	%	8,4
Delta 7-colesterolo	%	1,2
24-Metilencolesterolo	%	1,0
Campesterolo	%	13,1
Campestanolo	%	0,6
Stigmasterolo	%	8,9
Delta 7-campesterolo	%	1,0
Delta 5,23-stigmastadienolo	%	0,1
Clerosterolo	%	0,7
Beta-sitosterolo	%	41,5
Sitostanolo	%	0,3
Delta 5-avenasterolo	%	21,0
Delta 5,24-stigmastadienolo	%	1,1
Delta 7-stigmastenolo	%	0,2
Delta 7-avenasterolo	%	0,9
Steroli totali NGD C72-1989	mg/Kg	6431
• Determinazione dei Tocopheroli e Tocotrienoli mediante HPLC Metodo interno		
• Delta tocotrienolo	mg/Kg	< 1
• Beta+gamma tocotrienolo	mg/Kg	138
• Alfa tocotrienolo	mg/Kg	8
• TOTALE TOCOTRIENOLI	mg/Kg	146
• Delta tocoferolo	mg/Kg	< 1
• Beta+gamma tocoferolo	mg/Kg	122
• Alfa tocoferolo	mg/Kg	6
• TOTALE TOCOFEROLI	mg/Kg	128
• TOTALE TOCOFEROLI e TOCOTRIENOLI	mg/Kg	274

(*) Le prove contrassegnate dall'asterisco non sono accreditate da ACCREDIA

Il Responsabile del Servizio
Dott.ssa Pierangela Rovellini




Il Direttore Generale
Dott. Marco Suardi


Il risultato delle prove si riferisce soltanto al campione ricevuto, e non al lotto che il campione rappresenta.
I campioni si conservano per tre mesi dalla data di fatturazione.
La riproduzione parziale del presente rapporto di prova non è ammessa, salvo autorizzazione scritta della Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.

TRADUCCIÓN OFICIAL # 1 COLO 5769 realizada el día 10 de diciembre de 2012 por SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA, Abogada y Traductora Oficial de Confianza de las Embajadas de Italia y Suiza en Colombia, nombrada para el cargo mediante Resolución Min-Justicia N° 735 del 20 de Septiembre de 2001.

SSOG – STAZIONE SPERIMENTALE PER LE INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI

ILAC MRA – ACCREDIA LAB N° 0137

Sigue dirección, telefax, Código Fiscal y Partida IVA 01071130155 - <http://www.ssog.it>

Reporte de prueba N° 11LA01742

Comitente

SUNCHEM SRL

VIA DEL PARCO TECNOLOGICO, 6

26041 CASALMAGGIORE CR

Fecha de la muestra

Fecha de aceptación: **12/04/2011**

Fecha de inicio de las pruebas: **12/04/2011**

Fecha de finalización de las pruebas: **22/04/2011**

Fecha de emisión: **05/05/2011**

Descripción: **ACEITE DE SEMILLAS**

Etiqueta: **CAMP. 2 – 10/4/11**

Empaque: **contenedor de PE**

Sellos: **ausentes**

Muestreo realizado por: **el Cliente**



SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA
Traductora e Intérprete Oficial
Resolución Ministerio de Justicia Nº 735 del 20 de septiembre de 2001

Prueba Método	Unidad de medida	Resultado
* Ceras (36-46 átomos de carbono)	mg/Kg	64,5
* TRIACILGLICEROLES CLASES ECN (HPLC) Método Interno		
* ECN 40	%	1,66
* ENC 42	%	45,38
* ECN 44	%	33,20
* ECN 46	%	15,49
* ECN 48	%	3,62
* ECN 50	%	0,60
* ECN 52	%	0,06
* ACIDOS GRASOS OXIDADOS TOTALES NGD C88-2007	%	2,13
* Acidos Grasos Oxidados (Hidroxis, Hidroperoxis C18:1 C18:2, C:18:3, Ceto C18:1)	%	0,73
* Acidos Grasos Oxidados (Ceto C18:2, C18:3)	%	1,40
ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS ISO 5508:1990 + ISO 12966-2:2011	%	
Acido mirístico	%	0,03
Acido pentadecanoico	%	0,02
Acido palmítico	%	8,12

Res. Ministerio
735
del 20 de
Septiembre
de 2001

Sandra Mónica Barriga Balma
ABOYADA TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL ITALIANO ESPAÑOL

Acido palmitoleico	%	0,12
Acido heptadecanoico	%	0,10
Acido heptadecenoico		0,04
Acido esteárico	%	2,78
Acido oleico	%	11,68
Acido linoleico	%	75,89
Acido linolenico	%	0,81
Acido octadecatetraenóico	%	0,02
Acido aráquico	%	0,16
Acido eicosenóico	%	0,10
Acido behénico	%	0,08
Acido erúcico	%	0,02
Acido lignocérico	%	0,03

El resultado de las pruebas se refiere únicamente a la muestra recibida y no al lote que la muestra representa.

Las muestras se conservan por tres meses desde la fecha de la facturación

La reproducción parcial del presente reporte de prueba no será admitida, salvo que haya sido expedida autorización por escrito de la Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.

Sigue a la página siguiente

SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA
 Traductora e Intérprete Oficial
 Resolución Ministerio de Justicia N° 735 del 20 de septiembre de 2001

SSOG – STAZIONE SPERIMENTALE PER LE INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI

ILAC MRA – ACCREDIA LAB N° 0137

Sigue dirección, telefax, Código Fiscal y Partida IVA 01071130155 - <http://www.ssog.it>

Sigue Reporte de prueba N° 11LA01742

Prueba Método	Unidad de medida	Resultado
ESTEROLES NGD C71-1989		
Colesterol		8,4
Delta 7 – colesterol	%	1,2
24 - Metilencolesterol	%	1,0
Campesterol	%	13,1
Campestanol	%	0,6
Estigmaesterol	%	8,9
Delta 7 – campesterol	%	1,0
Delta 5,23 – estigmastadienol	%	0,1
Colesterol	%	0,7
Beta- sitosterol	%	41,5
Sitostanol	%	0,3
Delta 5 – avenasterol	%	21,0
Delta 5,24 – estigmastadienol	%	1,1
Delta 7 – estigmastenol	%	0,2
Delta 7 –avenasterol	%	0,9
Esteroles totales NGD C72-1989	mg/Kg	6461
* Determinación de los Tocoferoles y Tocotrienoles mediante HPLC		

Res. Ministerio
 735
 del 20 de
 Septiembre
 de 2001
 SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA
 ABOGADA TRADUCTORA E INTÉRPRETE OFICIAL
 ESPANOL ITALIANO - ESPANOL

Método interno		
* Delta tocotrienol	mg/Kg	< 1
* Beta + gamma tocotrienol	mg/Kg	138
* Alfa tocotrienol	mg/Kg	8
* TOTAL TOCOTRIENOS	mg/Kg	146
* Delta tocoferol	mg/Kg	< 1
*Beta + gamma tocoferol	mg/Kg	122
* Alfa tocoferol	mg/Kg	6
* TOTAL TOCOFEROS	mg/Kg	128
* TOTAL TOCOFEROS Y TOCOTRIENOS	mg/Kg	274

(*) Las pruebas marcadas con el asterisco no están acreditadas por ACCREDIA

El Responsable del Servicio - Dra. Pierangela Rovellini. Firmado ilegible.

El Director General - Dr. Marco Surdi. Firmado ilegible.

Hay sello redondo y humedo de la "Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi"

El resultado de las pruebas se refiere únicamente a la muestra recibida y no al lote que la muestra representa.

Las muestras se conservan por tres meses desde la fecha de la facturación

La reproducción parcial del presente reporte de prueba no será admitida, salvo que haya sido expedida autorización por escrito de la Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.



ANEXO 3

Rapporto di prova n°: **11LA01745**

Comittente

SUNCHEM SRL

VIA DEL PARCO TECNOLOGICO, 6
26041 CASALMAGGIORE CR

Dati del campione

Data accettazione: 12/04/2011

Data inizio prove: 12/04/2011

Data fine prove: 22/04/2011

Data emissione: 05/05/2011

Descrizione: SEMI

Etichetta: Campione 2 Seme - A seguito della richiesta del cliente viene riportata la seguente dicitura: olio tabacco estrazione chimica

Imballaggio: sacchetto di polietene

Sigilli: assenti

Campionamento eseguito da: Cliente

Prova Metodo	Unità di misura	Risultato
• Estrazione olio da semi Metodo interno		
• Cere (36-46 atomi di carbonio)	mg/Kg	530,2
• TRIACILGLICEROLI CLASSI ECN (HPLC) Metodo interno		
• ECN40	%	1,73
• ECN42	%	43,89
• ECN44	%	33,66
• ECN46	%	16,32
• ECN48	%	3,96
• ECN50	%	0,54
• ECN52	%	< 0,01
• ACIDI GRASSI OSSIDATI TOTALI NGD C88-2007	%	9,51
• Acidi Grassi Ossidati (Idrossi, Idroperossi C18:1, C18:2, C18:3, Cheto C18:1)	%	1,86
• Acidi Grassi Ossidati (Cheto C18:2, C18:3)	%	7,65
ESTERI METILICI DEGLI ACIDI GRASSI ISO 5508:1990 + ISO 12966-2:2011		
Acido miristico	%	0,08
Acido pentadecanoico	%	0,03
Acido palmitico	%	9,48
Acido palmitoleico	%	0,14
Acido eptadecanoico	%	0,11
Acido eptadecenoico	%	0,12
Acido stearico	%	3,06
Acido oleico	%	11,63
Acido linoleico	%	73,93
Acido linolenico	%	0,84
Acido arachico	%	0,22
Acido eicosenoico	%	0,09
Acido beenico	%	0,17

Il risultato delle prove si riferisce soltanto al campione ricevuto, e non al lotto che il campione rappresenta.

I campioni si conservano per tre mesi dalla data di fatturazione.

La riproduzione parziale del presente rapporto di prova non è ammessa, salvo autorizzazione scritta della Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.

Segue rapporto di prova n°: **11LA01745**

Prova Metodo	Unità di misura	Risultato
Acido erucico	%	0,04
Acido lignocericico	%	0,06
STEROLI NGD C71-1989		
Colesterolo	%	7,6
Delta 7-colesterolo	%	0,8
24-Metilencolesterolo	%	1,1
Campesterolo	%	15,8
Campestanolo	%	1,9
Stigmasterolo	%	15,1
Delta 7-campesterolo	%	0,3
Delta 5,23-stigmastadienolo	%	0,2
Clerosterolo	%	0,6
Beta-sitosterolo	%	38,8
Sitostanolo	%	0,6
Delta 5-avenasterolo	%	15,8
Delta 5,24-stigmastadienolo	%	0,7
Delta 7-stigmastenolo	%	0,1
Delta 7-avenasterolo	%	0,6
Steroli totali NGD C72-1989	mg/Kg	6724
* Determinazione dei Tocoferoli e Tocotrienoli mediante HPLC Metodo interno		
* Delta tocotrienolo	mg/Kg	4
* Beta+gamma tocotrienolo	mg/Kg	118
* Alfa tocotrienolo	mg/Kg	8
* TOTALE TOCOTRIENOLI	mg/Kg	130
* Delta tocoferolo	mg/Kg	< 1
* Beta+gamma tocoferolo	mg/Kg	132
* Alfa tocoferolo	mg/Kg	4
* TOTALE TOCOFEROLI	mg/Kg	136
* TOTALE TOCOFEROLI e TOCOTRIENOLI	mg/Kg	266

(*) Le prove contrassegnate dall'asterisco non sono accreditate da ACCREDIA

Il Responsabile del Servizio
Dott.ssa Pierangela Rovellini



Il Direttore Generale
Dott. Marco Sardi

Il risultato delle prove si riferisce soltanto al campione ricevuto, e non al lotto che il campione rappresenta.
I campioni si conservano per tre mesi dalla data di fatturazione.
La riproduzione parziale del presente rapporto di prova non è ammessa, salvo autorizzazione scritta della Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.

SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA
Traductora e Intérprete Oficial
Resolución Ministerio de Justicia N° 735 del 20 de septiembre de 2001

TRADUCCIÓN OFICIAL # 1.1 COLO 5769 realizada el día 10 de diciembre de 2012 por SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA, Abogada y Traductora Oficial de Confianza de las Embajadas de Italia y Suiza en Colombia, nombrada para el cargo mediante Resolución Min-Justicia N° 735 del 20 de Septiembre de 2001.

SSOG – STAZIONE SPERIMENTALE PER LE INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI

ILAC MRA – ACCREDIA LAB N° 0137

Sigue dirección, telefax, Código Fiscal y Partida IVA 01071130155 - <http://www.ssog.it>

Reporte de prueba N° 11LA01745

Comitente

SUNCHEM SRL

VIA DEL PARCO TECNOLOGICO, 6

26041 CASALMAGGIORE CR

Fecha de la muestra

Fecha de aceptación: **12/04/2011**

Fecha de inicio de las pruebas: **12/04/2011**

Fecha de finalización de las pruebas: **22/04/2011**

Fecha de emisión: **05/05/2011**

Descripción: **SEMILLAS**

Etiqueta: **Muestra 2 Semillas – Luego de la solicitud del cliente, se reportó la siguiente leyenda: aceite tabaco extracción química**

Empaque: **bolsa de polietileno**

Sellos: **ausentes**



Muestreo realizado por: el Cliente

Prueba Método	Unidad de medida	Resultado
* Extracción aceite de semillas Método Interno		
* Ceras (36-46 átomos de carbono)	mg/Kg	530,2
* TRIACILGLICEROLES CLASES ECN (HPLC) Método Interno		
* ECN 40	%	1,73
* ENC 42	%	43,89
* ECN 44	%	33,56
* ECN 46	%	16,32
* ECN 48	%	3,96
* ECN 50	%	0,54
* ECN 52	%	< 0,01
* ACIDOS GRASOS OXIDADOS TOTALES NGD C88-2007	%	9,51
* Acidos Grasos Oxidados (Hidroxis, Hidroperoxis C18:1 C18:2, C:18:3, Ceto C18:1)	%	1,86
* Acidos Grasos Oxidados (Ceto C18:2, C18:3)	%	7,65
ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS ISO 5508:1990 + ISO 12966-2:2011	%	

Res. Ministerio
735
del 20 de
Septiembre
de 2001

Sandra Mónica Barriga Balma
ABOGADA, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

SB

ESPAÑOL - ITALIANO - ESPAÑOL

Acido mirístico	%	0,08
Acido pentadecanoico	%	0,03
Acido palmítico	%	9,48
Acido palmitoleico	%	0,14
Acido heptadecanoico	%	0,11
Acido heptadecenoico		0,12
Acido esteárico	%	3,06
Acido oleico	%	11,63
Acido linoleico	%	73,93
Acido linolenico	%	0,84
Acido aráquico	%	0,22
Acido eicosenóico	%	0,09
Acido behénico	%	0,17

El resultado de las pruebas se refiere únicamente a la muestra recibida y no al lote que la muestra representa.

Las muestras se conservan por tres meses desde la fecha de la facturación

La reproducción parcial del presente reporte de prueba no será admitida, salvo que haya sido expedida autorización por escrito de la Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.

Sigue a la página siguiente

Acido erúcico	%	0,04
Acido lignocérico	%	0,06



SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA
Traductora e Intérprete Oficial
Resolución Ministerio de Justicia N° 735 del 20 de septiembre de 2001

SSOG – STAZIONE SPERIMENTALE PER LE INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI

ILAC MRA – ACCREDIA LAB N° 0137

Sigue dirección, telefax, Código Fiscal y Partida IVA 01071130155 - <http://www.ssog.it>

Sigue Reporte de prueba N° 11LA01745

Prueba Método	Unidad de medida	Resultado
ESTEROLES <i>NGD C71-1989</i>		
Colesterol	%	7,6
Delta 7 – colesterol	%	0,8
24 - Metilencolesterol	%	1,1
Campesterol	%	15,8
Campestanol	%	1,9
Estigmaesterol	%	15,1
Delta 7 – campesterol	%	0,3
Delta 5,23 – estigmastadienol	%	0,2
Colesterol	%	0,6
Beta- sitosterol	%	38,8
Sitostanol	%	0,6
Delta 5 – avenasterol	%	15,8
Delta 5,24 – estigmastadienol	%	0,7
Delta 7 – estigmastenol	%	0,1
Delta 7 –avenasterol	%	0,6
Esteroles totales <i>NGD C72-1989</i>	mg/Kg	6724
* Determinación de los Tocoferoles y Tocotrienoles mediante HPLC		

Res. Ministerio
735
del 20 de
Septiembre
de 2001

Sandra Mónica Barriga Balma
ABOGADA, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

SB

ESPAÑOL ITALIANO - ESPAÑOL

Método interno		
* Delta tocotrienol	mg/Kg	4
* Beta + gamma tocotrienol	mg/Kg	118
* Alfa tocotrienol	mg/Kg	8
* TOTAL TOCOTRIENOS	mg/Kg	130
* Delta tocoferol	mg/Kg	< 1
*Beta + gamma tocoferol	mg/Kg	132
* Alfa tocoferol	mg/Kg	4
* TOTAL TOCOFEROS	mg/Kg	136
* TOTAL TOCOFEROS Y TOCOTRIENOS	mg/Kg	266

(*) Las pruebas marcadas con el asterisco no están acreditadas por ACCREDIA

El Responsable del Servicio - Dra. Pierangela Rovellini. Firmado ilegible.

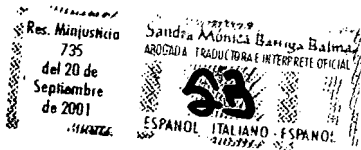
El Director General - Dr. Marco Surdi. Firmado ilegible.

Hay sello redondo y humedo de la "Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi"

El resultado de las pruebas se refiere únicamente a la muestra recibida y no al lote que la muestra representa.

Las muestras se conservan por tres meses desde la fecha de la facturación

La reproducción parcial del presente reporte de prueba no será admitida, salvo que haya sido expedida autorización por escrito de la Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.



ANEXO 4

64

Rapporto di prova n°: **10LA01350**

Committente

IDROEDIL SRL

VIA C.COLOMBO, 54 INT.1
18018 ARMA DI TAGGIA IM

Dati del campione

Data accettazione: **20/05/2010**

Data inizio prove: **20/05/2010**

Data fine prove: **25/05/2010**

Data emissione:

Descrizione: **SEME TABACCO**

Etichetta: **Tabacco GIZA 1 2010**

Imballaggio: **sacchetto di carta**

Sigilli: **assenti**

Campionamento eseguito da: **Cliente**

Prova Metodo	Unità di misura	Risultato
* Acidità, espressa come acido oleico NGD C10-1976	%	0,27
* SOSTANZA GRASSA - seme NGD B4-1976	%	36,60
UMIDITA' E SOSTANZE VOLATILI - seme NGD B2-1976	%	4,75
* Preparazione dei metil esteri ISO 5509-1990		
Analisi gascromatografica degli acidi grassi ISO 5508-1990		
* Acido palmitico	%	8,30
* Acido palmitoleico	%	0,11
* Acido stearico	%	2,74
* Acido oleico	%	12,03
* Acido linoleico	%	75,24
* Acido linolenico	%	1,32
* Acido arachico	%	0,16
* Acido eicosenoico	%	0,10

(*) Le prove contrassegnate dall'asterisco non sono accreditate dal SINAL.

Il Responsabile del Servizio
Dott. Paolo Federico Bondioli

Il Direttore Generale
Dott. Marco Surdi

*Il risultato delle prove si riferisce soltanto al campione ricevuto, e non al lotto che il campione rappresenta.
I campioni si conservano per tre mesi dalla data di fatturazione.*

La riproduzione parziale del presente rapporto di prova non è ammessa, salvo autorizzazione scritta della Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.

TRADUCCIÓN OFICIAL # 1.2 COLO 5769 realizada el día 10 de diciembre de 2012 por SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA, Abogada y Traductora Oficial de Confianza de las Embajadas de Italia y Suiza en Colombia, nombrada para el cargo mediante Resolución Min-Justicia N° 735 del 20 de Septiembre de 2001.

SSOG – STAZIONE SPERIMENTALE PER LE INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI

SINAL N° 0137 – ILAC - MRA

Sigue dirección, telefax, Código Fiscal y Partida IVA 01071130155 - <http://www.ssoq.it>

Reporte de prueba N° 10LA01350

Comitente

IDROEDIL SRL

VIA C. COLOMBO, 54 INT. 1

18018 ARMA DI TAGGIA IM

Fecha de la muestra

Fecha de aceptación: **20/05/2010**

Fecha de inicio de las pruebas: **20/05/2010**

Fecha de finalización de las pruebas: **25/05/2010**

Fecha de emisión: En blanco

Descripción: **SEMILLAS DE TABACO**

Etiqueta: **Tabaco GIZA 1 2010**

Empaque: **bolsa de papel**

Sellos: **ausentes**

Muestreo realizado por: **el Cliente**



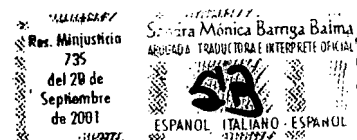
SANDRA MÓNICA BARRIGA BALMA
Traductora e Intérprete Oficial
Resolución Ministerio de Justicia N° 735 del 20 de septiembre de 2001

Prueba <i>Método</i>	Unidad de medida	Resultado
* Acidez, expresada como ácido oleico <i>NGD C10-1976</i>	%	0,27
* SUSTANCIA GRASA - semillas <i>NGD B4-1976</i>	%	36,60
HUMEDAD Y SUSTANCIAS VOLATILES – semillas <i>NGD B2-1976</i>	%	4,75
* Preparación de metil ésteres <i>ISO 5509-1990</i>		
Análisis gascromatográfico de los ácidos grasos <i>ISO 5508-1990</i>		
Acido palmítico	%	8,30
Acido palmitoleico	%	0,11
Acido esteárico	%	2,74
Acido oleico	%	12,03
Acido linoleico	%	75,24
Acido linolenico	%	1,32
Acido aráquico	%	0,16
Acido eicosenóico	%	0,10

(*) Las pruebas marcadas con el asterisco no están acreditadas por SINAL

El Responsable del Servicio – Dr. Paolo Federico Bondioli – sin firma

El Director General - Dr. Marco Surdi – sin firma



El resultado de las pruebas se refiere únicamente a la muestra recibida y no al lote que la muestra representa.

Las muestras se conservan por tres meses desde la fecha de la facturación

La reproducción parcial del presente reporte de prueba no será admitida, salvo que haya sido expedida autorización por escrito de la Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi.

Página 1 de 1



ANEXO 5

INDUSTRIAL CROPS
AND PRODUCTS
DIARIO INTERNACIONAL

Industrial Crops and Products 16 (2002) 1-9

www.elsevier.com/locate/indcrop

**Aceite de Semilla de Tabaco como Combustible Diesel Alternativo:
Propiedades Físicas y Químicas**

P.N. Giannelos, F. Zannikos, S. Stournas, E. Lois*, G. Anastopoulos

Departamento de Ingeniería Química, National Technical University of
Athens, Iroon polytechniou 9, Atenas 157 80, Grecia

Aceptado el 19 de Diciembre de 2001

Resumen

La semilla de tabaco es un subproducto de la producción de hojas de tabaco. Esta semilla de aceite fue evaluada en este estudio, como una fuente de energía renovable y potencial. La extracción sucesiva de aceite de semillas de tabaco indicó que casi el 38% de la semilla es aceite. Los principales componentes observados en el análisis GC fueron ácido linoleico (18:2), ácido oleico (18:1) y ácido palmítico (16:0). Las propiedades físicas, químicas y relacionadas con combustible del aceite de semillas de tabaco fueron investigadas en este trabajo. Estas propiedades se compararon con las de otros aceites vegetales y con las actuales Especificaciones europeas para combustible diesel automotriz. Este estudio sugiere que el aceite de semilla de tabaco puede ser utilizado como combustible diesel alternativo.



comestible puede ser un sustituto adecuado para mercados nichos específicos tales como tractores o vehículos que se mueven internamente en las ciudades. Por otro lado, el aceite de semilla de tabaco como combustible representa una posible esperanza para el futuro de la agricultura del tabaco en la Unión Europea. © Publicado en 2002 por Elsevier Science B.V.

Palabras Clave: *Aceite de semilla de tabaco; extracción con disolvente; Propiedades físicas; Propiedades del combustible; Composición de ácidos grasos.*

1. Introducción

Los aceites agrícolas, sin tratar o modificados químicamente, tienen el potencial para sustituir una fracción de destilados de petróleo y productos petroquímicos derivados del petróleo en un futuro próximo. El material de rango de ebullición del diesel es de particular interés porque ha demostrado reducir significativamente las emisiones de partículas del diesel de petróleo. Estudios recientes indican que el número de cetano, el contenido aromático, el contenido de azufre, la temperatura de destilación, y la densidad son factores importantes para el control de emisiones (Kuljuka et al., 1998; Lee et al., 1998; Ryan et al., 2000). La reducción en el contenido aromático y/o la eliminación de fracciones pesadas, o el uso de combustible más ligero se consideran eficaces para este propósito (Walsh, 1998).

La demanda de combustibles derivados del petróleo está cambiando. Para la gasolina y los destilados medios incluyendo el combustible diesel, está aumentando pero con una fuerte disminución de combustibles pesados. Por lo tanto es difícil reducir el contenido aromático y la fracción pesada en combustible diesel para satisfacer las necesidades (Nikolaján, 1993). La



producción de combustible limpio económicamente viable seguirá siendo un reto en los años venideros.

El desarrollo de sustitutos derivados de la biomasa para el combustible diesel es una posible salida atractiva, ya que podría ayudar a mejorar la calidad del combustible diesel. Entre las diferentes posibles fuentes, los combustibles diesel derivados de aceites vegetales presentan una alternativa prometedora para sustituir los combustibles diesel. Hay más de 350 cultivos de aceite productivos identificados, entre los cuales sólo los aceites de girasol, cártamo, soya, semilla de algodón, colza y maní son considerados como posibles combustibles alternativos para motores diesel. Estos aceites de semillas orgánicas son mejores que el combustible diesel en términos de contenido de azufre, punto de inflamación, contenido aromático y biodegradabilidad.

Los aceites vegetales tienen estructuras químicas diferentes a los combustibles diesel derivados del petróleo. Hasta tres ácidos grasos están ligados a una molécula de glicerol con enlaces de ester. El componente básico de los aceites vegetales son los triglicéridos. Con pocas excepciones, los ácidos grasos de los cuales se derivan los aceites vegetales, son todos compuestos de cadena recta que varían de tamaño de 3 a 18 átomos de carbono.

Muchas naciones que dependen de sus condiciones de clima y suelo, están estudiando diferentes aceites vegetales como alternativa a los combustibles diesel. Grecia, un importante productor de tabaco a nivel internacional, es uno de los once países en los que crece aproximadamente el 80% del tabaco mundial. La producción mundial de tabaco no manufacturado para el año

Fidel M. García
 INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCIÓN 468/94
 MINIAJUSTICIA
 FIDEL ANTONIO MURCIA DE LOS RIOS

2000 fue estimada en 7.722.327 t (Departamento de Agricultura de Los Estados Unidos, 2000), mientras que la cosecha del 2000 en Grecia se estimó en 123.704 t (Centro Nacional de Tabaco de Grecia, 2000).

La semilla de tabaco (Fig. 1) es un subproducto de la producción de hojas de tabaco en Grecia y en otros países. Las semillas de la planta de tabaco son muy pequeñas en tamaño, pero vienen en una gran cantidad por planta (Chras, 1997). Pueden conservarse durante mucho tiempo si se almacenan en condiciones secas, resistentes a la humedad más alta en temperaturas normales y tienen una cáscara fuerte. El endosperma de las semillas de tabaco contiene células con membrana delgada, ricas en aceite. El aceite extraído de las semillas de tabaco es un aceite no comestible, y las propiedades físicas y químicas de este aceite no están disponibles en la literatura. Los objetivos de esta investigación fueron analizar diversas propiedades del aceite de semilla de tabaco relacionadas con el combustible. Estas propiedades se compararon con las de otros aceites vegetales y con los requerimientos Griegos para aceites de petróleo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Procedimiento de Extracción – Contenido de aceite de semilla de tabaco

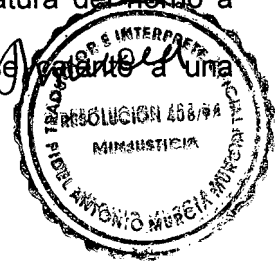
El aceite de hojas de tabaco fue extraído con disolvente hexano y el aceite se separó del solvente usando un evaporador rotatorio de vacío. Las semillas se secaron durante 1 hora a 60-70°C, molidas y extraídas. El extracto se concentró con el evaporador rotatorio de vacío, secado y pesado. Se calculó el rendimiento como calculado sobre la base del (Papageorgiou et al, 1996).



Se pesó una muestra representativa de la tierra de semillas de tabaco y el aceite se extrajo usando éter de petróleo según los procedimientos operativos estandarizados por la GIPSA (Administración de Inspección de Granos, Empacadores y Corrales del departamento de agricultura de los Estados Unidos). Al finalizar el proceso de extracción, se calculó el contenido de aceite de la muestra de suelo. Al finalizar el proceso de extracción, se calculó el contenido de aceite de la muestra de suelo. El método utilizado fue una modificación del método oficial Ac 3-44 de la AOCS (Sociedad Química Americana de Aceite) (OAC, 1995), donde mantuvimos la temperatura del dispositivo soxtec en 120°C en lugar de 100°C y el proceso de extracción duró 15 minutos, mientras que el proceso de destilación duró 45 minutos.

2.2. Composición del ácido graso de aceite de semilla de tabaco

La composición de ácidos grasos del aceite de semilla de tabaco se determinó mediante análisis GC. Se utilizó un Cromatógrafo de Gases, serie II 5890 Hewlett Packard, con una columna (compañía Supelco) tipo SP2340 de 60 m de largo y un inyector con/sin división. El diámetro interior fue de 0,25 mm y el espesor de la película fue 0,20 μm . El detector fue un FID. Se colocó un muestreador automático al Cromatógrafo de Gases HP 5890 para automatizar la introducción de la muestra. La cantidad de muestra (aceite de semilla de tabaco) inyectada fue 0.5 μl . La temperatura del inyector del GC fue 230°C. Se utilizó helio como gas portador. La temperatura del detector de ionización de llama fue de 230°C. Se mantuvo la temperatura del horno a 175°C durante 31 minutos. Después de eso, el horno se calentó a una



relación de $3.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a 220°C . La temperatura del horno fue constante durante 5 minutos. La temperatura final fue de 220°C . Los ácidos grasos del aceite de semilla de tabaco fueron identificados y cuantificados mediante el estándar de larodan 905518.

2.3. Propiedades Físicas y Químicas del aceite de semilla de tabaco

Se analizaron las propiedades físicas y químicas del aceite de semilla de tabaco, empleando los procedimientos estándar que se muestran en la Tabla 1. Sin embargo, ya que bajas cantidades de aceite de semilla de tabaco estaba disponible para la determinación del número de cetano utilizando los métodos estándar, se estableció un número de cetano calculado de acuerdo a Goering et al. (1982).

3. Resultados y Discusión

La producción del aceite de semillas de tabaco osciló entre 36.2 y 41.4% (promedio L_1 38.8%) en peso seco, mediante la extracción de hexano de columna soxhlet, $L_2=33.4\%$, usando la extracción de éter de petróleo del aparato soxtec. Estos valores indican que las semillas de tabaco son ricas en aceite.

La Fig 2. presenta la cromatografía de gases del aceite de semillas de tabaco. El total de la composición de ácidos grasos saturados e insaturados del aceite de semilla de tabaco fue de 14.8 y 85.2%, respectivamente (Tabla 2). El aceite linoleico (18:2) y oleico fueron los dos ácidos insaturados más abundantes (69.49 y 14.54%, respectivamente).

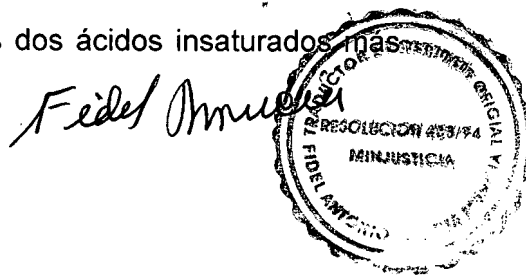


Tabla 1
Determinación de propiedades físicas y químicas usando métodos estándar

Propiedades Físicas y Químicas	Método Estándar	Unidad
Densidad	ASTM D4052-91 (1995c)	g/ml
Cantidad de Yodo	AOC CD1-25 1993	Centigramos l/g aceite
Valor de Saponificación	AOC CD3-25 1997	Mg KOH/G aceite
Contenido Energético	ASTM D2015-85 (1998)	MJ/kg
Punto de Enturbamiento	ASTM D2500-91 (1995b)	°C
Punto de Fluidez	ASTM D97-93 (1995f)	°C
Punto de Inflamación	ASTM D93-94 (1995c)	°C
Número Cetano	ASTM D613 (1979)	-
Viscosidad Cinemática	ASTM D44 (IP 71)	cSt en 40°C
Contenido de Azufre	ASTM D5453-93 (1995d)	wt. %
Ceniza	ASTM D482-91 (1995a)	wt. %

Aunque sólo se producen naturalmente ácidos con un número par de átomos de carbono, el aceite de semilla de tabaco contiene una pequeña cantidad de ácidos heptadecanoicos y heptadecenoicos.

Un resumen de las propiedades físicas y químicas del aceite de semilla de tabaco (extraído del hexano de columna soxhlet) y otros aceites de semilla utilizados para la producción de biodiesel, así como los requisitos Griegos para combustible diesel de automotor, se enumeran en la Tabla 3. La Tabla 4 presenta algunas propiedades físicas y químicas del aceite de semilla de tabaco de otro estudio. La mayoría de los valores fueron similar a los nuestros, excepto el contenido de yodo y el contenido ácido palmítico, indicando que las diferencias del mismo material sin tratar pueden existir en diferentes regiones geográficas.

Durante nuestros experimentos, la densidad del aceite de semilla de tabaco fue de 0.9175 kg/l. Aunque la densidad del aceite de semillas de tabaco fue similar a las de los otros aceites vegetales, es superior a la normativa Europea, por lo cual cumple las especificaciones Griegas, indicando que la densidad de los combustibles diesel después del inicio del año 2000 debe estar en el rango de 0.820-0.845 kg/l.

Fidel Murcia
DIRECTOR E INTERPRETE ENCI
RESOLUCION 488/94
MINISTERIO DE JUSTICIA
FIDEL ANTONIO MURCIA

Por lo tanto, la medición volumétrica del aceite de semilla de tabaco (como en los inyectores de unidad utilizados en motores diesel modernos) resulta en la entrega de mayor masa de combustible. Sin embargo, los aceites vegetales tienen un menor contenido energético en la base volumétrica y de masa. Por lo tanto, aunque un inyector de unidad podría ofrecer una mayor masa de combustible, la energía real entregada es menor que la de los combustibles diesel convencionales.

El número de yodo es una medida del grado de insaturación del combustible. La experiencia de Mercedes Benz sugiere que no es aceptable el combustible con contenido de yodo superior a 115 debido a depósitos de carbón excesivo (Shafer, 1994). El contenido de yodo de la mayoría de aceites vegetales estuvo dentro del rango de 105-130. El contenido de yodo del aceite de semilla de tabaco es mayor que la de los otros aceites, y el valor máximo establecido por regulaciones de la Unión Europea, establece un valor máximo para el Contenido de Yodo en 120.

Este resultado fue el esperado, ya que se basa en el mayor grado de insaturación de este aceite. La insaturación en la cadena de ácido graso es la principal fuente de inestabilidad en los aceites vegetales (Stavinoha y Howell, 1999). Si hay dos o más dobles enlaces, estos tienen un efecto mutuamente activador. Los metales y elastómeros en contacto con aceites vegetales durante el almacenamiento también pueden afectar la estabilidad.

Oxidación conduce a la formación de hidroperóxidos, que pueden atacar elastómeros o polimerizar para formar resinas insolubles. La eliminación de la insaturación por hidrogenación conduce a un empeoramiento de las propiedades de flujo frío (Graboski y McCormick, 1998).



debe ser enfocada a aditivos que puedan actuar para estabilizar las uniones insaturadas en aceites vegetales para obtener una estabilidad aceptable.

Tabla 2
Composición de ácidos grasos de aceite de semillas de tabaco

Número de Carbonos	Ácido Graso	Estructura Química	Peso %
8	Caprílico [ácido carboxílico C ₈]	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	<0.01
10	Capríl [ácido carboxílico C ₁₀]	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	<0.01
12	Láurico [ácido carboxílico C ₁₂]	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	<0.01
14	Mirístico [ácido carboxílico C ₁₄]	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	0.09
16	Palmitico [ácido carboxílico C ₁₆]	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	10.96
16	Palmitoléico [ácido cis-9-Hexadecanoico]	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH= (CH ₂) ₇ COOH	0.20
17	Heptadecanoico [ácido carboxílico C ₁₇]	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	0.10
17	Heptadecenoico [ácido cis-9-Hexadecanoico]	CH ₃ (CH ₂) ₆ CH= (CH ₂) ₇ COOH	0.05
18	Estearico [ácido carboxílico C ₁₈]	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	3.34
18	Oleico [ácido cis-9-Octadecenoico]	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH= (CH ₂) ₇ COOH	14.54
18	Linoléico [ácido cis, cis-9-12-Octadecadienoico]	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₂ CH= CH) ₂ (CH ₂) ₇ COOH	69.49
18	Linolénico [ácido cis, cis, cis-9, 12, 15-Octadecatrienoico]	CH ₃ (CH ₂ CH= CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOH	0.69
18	Eláidico [ácido trans-9-Octadecenoico]	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH= CH(CH ₂) ₇ COOH	0.02
18	C18:2 [ácido trans, trans-9, 12-Octadecadienoico]	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH= CH) ₂ (CH ₂) ₇ COOH	0.04
18	C18:3 [ácido trans,trans, trans-9, 12-15-Octadecadienoico]	CH ₃ (CH ₂ CH=CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOH	0.03
20	Eicosanoico [ácido carboxílico C ₂₀]	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	0.25
20	Eicosenoico [ácido carboxílico C ₂₀]	CH ₃ (CH ₂) ₈ CH=CH(CH ₂) ₈ COOH	0.13
22	Behénico [ácido carboxílico]	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	0.12
22	Erúico [ácido cis-13-docosanoico]	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH	<0.01
24	Lignocérico [ácido carboxílico C ₂₄]	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	0.04

El valor de saponificación del aceite de semilla de tabaco estuvo dentro del rango de valor de saponificación de todos los otros aceites vegetales. Este valor reflejó la duración media de la cadena del ácido graso de este aceite.

El HHV del aceite de semillas de tabaco, calculado mediante la ecuación de Demirba (Demirba, 1998), mostró una diferencia de 0.032% del valor medido.

El contenido energético de este aceite fue de 39.4 MJ/kg. Este valor fue casi lo mismo que los otros aceites vegetales. El contenido energético de la mayoría de aceites vegetales es aproximadamente 12% menor que el del combustible diesel automotriz utilizado en Grecia.

Las propiedades de flujo frío caracterizan el comportamiento del combustible a bajas temperaturas. El rendimiento insuficiente de flujo frío puede causar



serios problemas graves en regiones más frías, especialmente en invierno. En consecuencia, es importante garantizar el buen comportamiento de flujo frío debido al buen desempeño de flujo intrínsecamente del combustible o mediante la adición de aditivos adecuados. Los aditivos del mejorador de flujo frío pueden reducir el tamaño, o inhibir la formación de los cristales de cera formados al enfriamiento del combustible y así bajar la temperatura en la que la obstrucción de la cera se convierte en un problema (Botros, 1997). Una de las desventajas de los aceites de semilla utilizados es el rendimiento insuficiente de flujo frío durante el invierno (Graboski y McCormick, 1998). Según nuestros experimentos cuando el aceite de semilla de tabaco fue comparado con otros aceites vegetales, este tenía el punto más bajo de Enturbamiento de -78°C . Además, su punto de fluidez fue de -14°C , que está dentro del rango de 12 a -31°C (Goering et al, 1982) que reportó para aceites vegetales.

El punto de inflamación es una medida de la temperatura a la que un combustible debe ser calentado para que se pueda encender la mezcla de vapor y aire sobre el combustible. En comparación con los otros aceites vegetales, el aceite de semilla de tabaco tiene el menor punto de inflamación de 220°C . Todos los aceites vegetales tienen puntos de inflamación relativamente altos, por lo que se consideran combustibles seguros bajo condiciones normales.

Fidel Murcia



Tabla 3
Propiedades del Aceite de Tabaco y otros aceites vegetales – Requerimientos Griegos

Aceite Vegetal	Viscosidad Cinemática a 40°C	Número Cetaneo	Contenido Energético (MJ/kg)	Punto de Enturbamiento (°C)	Punto de Fluidez (°C)	Punto de Inflamación (°C)	Densidad (kg/l)	Azufre (wt.%)	Valor de Saponificación [mg KOH/gr]	Cantidad de Yodo	Ceniza (%)
Maiz	34.9	37.6	39.5	-1.1	-40.0	277	0.9095	0.010	187-195	122.6	0.01
Semilla de Algodón	33.5	41.8	39.5	1.7	-15.0	234	0.9148	0.010	189-198	105.7	0.01
Maní	39.6	41.8	39.8	12.8	-6.7	271	0.9026	0.010	187-196	-	0.005
Colza	37.0	37.6	39.7	-3.9	-31.7	246	0.9115	0.010	168-181	130.0	0.054
Sésamo	35.5	40.2	39.3	-3.9	-9.4	260	0.9133	0.010	187-195	106.6	<0.010
Soya	32.6	37.9	39.6	-3.9	-12.2	254	0.9138	0.010	189-195	112.5	<0.010
Girasol	33.9	37.1		7.2	-15.0	274	0.9161	0.010	188-194	125.5	<0.010
Aceite de tabaco	27.7	38.7	39.4	-7.8	-14.0	220	0.9175	0.006	193	135.0	0.008
Requerimientos Europeos (combustible diesel para automotores)	2-4.5	51 (min.)	-	-	-	56 (min.)	0.820-0.845	0.035 (máx.)	-	120	0.01 (máx.)



Tabla 4
Comparación de información física y química del aceite de semilla de tabaco de dos países

	Aceite de semilla de tabaco (Bajpai y Seth, 2000)	Aceite de Semilla de Tabaco (este trabajo)
Cantidad de Yodo	145	135
Valor de Saponificación	190.9	193
Ácido Linoléico, wt. %	70.0	69.49
Ácido Oléico, wt. %	16.0	14.54
Ácido Esteárico, wt. %	5.0	3.34
Ácido Palmítico, wt. %	3.0	10.96

Se ha encontrado que el punto de inflamación del aceite de semilla de tabaco es mucho mayor que el del combustible diesel para automotores utilizado en Grecia. El número cetano del combustible es una medida de su retraso de ignición con mayor número de cetano que indica el tiempo más corto entre la iniciación de la inyección de combustible y la ignición, una propiedad deseable en combustible de motor diesel.

El número de cetano calculado de aceite de semillas de tabaco fue 38.7. Este estaba dentro del rango típico de número de cetano de todos los aceites vegetales. Los números cetano de aceites vegetales aumentan con la esterificación. Después de este proceso, el número cetano podría ser mayor que el requisito mínimo Europeo de 51, para combustibles diesel de automotores

La viscosidad de un combustible líquido es importante para su flujo a través de las tuberías, inyectores, orificios y para la atomización de combustible en el cilindro (Goering et al, 1982). El principal problema asociado con el uso de aceites de vegetales puros como combustibles, para los motores diesel es causado por la alta viscosidad del combustible alta en la ignición por compresión.

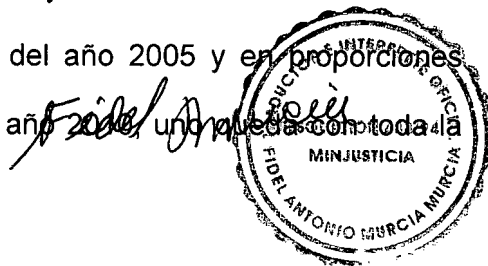
Los aceites vegetales eran extremadamente viscosos, con viscosidades que van de 10 - 20 veces más que el combustible diesel convencional (Reece y



Peterson, 1993). La viscosidad cinemática de los aceites vegetales, utilizados para la producción de biodiesel, varía en el rango de 30-40 cSt a 40°C. El aceite de semilla de tabaco era menos viscoso (27.7 cSt) en comparación con los otros aceites vegetales. La transesterificación, pirolisis o dilución reduciría su rendimiento en un motor diesel (Masjuki et al, 1993). Después de cualquiera de estos procesos, podría cumplirse el requisito Griego de máxima viscosidad 4.5 cSt para aceite de semillas de tabaco.

El contenido de azufre del aceite de semilla de tabaco, así como los otros aceites vegetales, fue menor a 0.035 que es el límite para el combustible diesel en Grecia. Los compuestos de azufre causan contaminación ambiental de sus productos de combustión y también son naturalmente corrosivos y causan varios problemas físicos a partes del motor. (Ryan et al. 2000). El contenido de cenizas del aceite de semillas de tabaco fue menor a 0.004 g/50 g de la muestra seca (<0.01 wt.%, que es el requisito Griego). Se concluyó que este contenido de ceniza era lo suficientemente bajo como para no causar problemas cuando se utiliza como combustible en motores diesel.

Una pregunta oportuna ya que el aceite vegetal podría utilizarse para la producción de biodiesel, es por un lado la combinación de su disponibilidad y costo del material sin tratar y, por otro lado, las especificaciones. Las últimas especificaciones Europeas de Biodiesel, establecen explícitamente los valores mínimo y máximo que deben tener los aceites vegetales, antes de que estos puedan ser utilizados. Si esto se combina con el hecho de que el uso de biodiesel en diesel de automotores y calefacción se convierte en obligatorio en la Unión Europea después del año 2005 y en proporciones graduales de hasta 5 por volumen para el año 2010, uno queda con toda la



opción abierta para utilizar distintos materiales de aceite vegetal, para satisfacer las necesidades locales.

4. Conclusiones

1. Se encontró que la semilla de tabaco es rica en aceite.
2. Las propiedades físicas, químicas y térmicas del aceite de tabaco, obtenidas en la presente investigación, se comparan con otros aceites vegetales.
3. La viscosidad del aceite de semilla de tabaco prohíbe su uso directo como combustible alternativo en los motores diesel, pero este podría ser utilizado en mezclas con diesel para automotores, o después de la transesterificación catalítica de sus triglicéridos con alcoholes formando ésteres monoalcalícos de ácidos grasos de cadena larga.
4. El uso de las semillas de tabaco por producto, para el aceite de semillas de tabaco o producción de biodiesel de aceite de semillas de tabaco, podría ser una atractiva aplicación alternativa de los cultivos de tabaco existentes en Grecia para nuevos mercados.
5. El último mandato de la Unión Europea, obliga a todos los estados miembros que después del año 2005 el biodiesel debe ser usado en el diesel para automotores y calefacción, y en proporciones crecientes de 2% por volumen y hasta 5% por volumen para el año 2010, es un fuerte incentivo para los países en donde crece el tabaco, para estudiar con más profundidad el aceite de semillas de tabaco como una posible alternativa para producción de biodiesel. Se requieren

Fidel Murcia



estudios para establecer las emisiones de motores y calderas, antes de que este sea introducido en el mercado.

Reconocimientos

Los autores quieren agradecer a los miembros de laboratorio de nutrición y patología del pescado, del Centro Nacional Griego de Investigación Marina por su colaboración durante el experimento del aparato Soxtec.

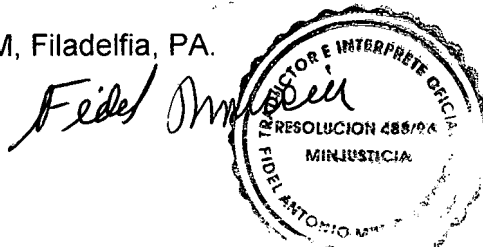
Referencias

Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), 1993. Sección C: Grasas y Aceites Comerciales, método oficial Cd 1-25 de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite (AOCS) para la Cantidad de Yodo. Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, Washington 2000.

Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), 1997. Sección C: Grasas y Aceites Comerciales, método oficial Cd 3-25 de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite (AOCS) para el Valor de Saponificación. Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, Washington 2000.

Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), 1995. Sección C: Grasas y Aceites Comerciales, método oficial Ac 3-44 de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite (AOCS) para el Contenido de Aceite. Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, Washington 2000.

ASTM, 1979. Método de Prueba Estándar para Calidad de Ignición de Combustibles Diesel por el Método del Cetano, Designación: D 613, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.04, ASTM, Filadelfia, PA.



ASTM, 1988. Método de Prueba Estándar para Poder Calorífico del Carbón y el Coque por el Calorímetro de Bomba Adiabática, Designación: D2015-85, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.02, ASTM, Filadelfia, PA. Pág. 238-243.

ASTM, 1995a. Método de Prueba Estándar para Ceniza de Productos del Petróleo, Designación: D482-91, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.01, ASTM, Filadelfia, PA. Pág. 198-199.

ASTM, 1995b. Método de Prueba Estándar para Punto de Enturbamiento de Productos del Petróleo, Designación: D2500-91, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.01, ASTM, Filadelfia, PA. Pág. 840-842.

ASTM, 1995c. Método de Prueba Estándar para Densidad y Densidad Relativa de Líquidos por medio del Medidor de Densidad Digital, Designación: D4052-91, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.02, ASTM, Filadelfia, PA. Pág. 684-687.

ASTM, 1995d. Método de Prueba Estándar para la Determinación del Total de Azufre en Hidrocarburos Livianos, Combustibles para Motor y Aceites de Fluorescencia Ultravioleta, Designación: D5453-93, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.03, ASTM, Filadelfia, PA. Pág. 603-608.

ASTM, 1995e. Método de Prueba Estándar para el Punto de Inflamación usando el Probador de Copa Cerrada Pensky-Martens, Designación: D93-94, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.01, ASTM, Filadelfia, PA. Pág. 31-44.

ASTM, 1995f. Método de Prueba Estándar para el Punto de Fluidéz de Productos del Petróleo, Designación: D97-93, Libro Anual de Estándares ASTM, vol. 05.01, ASTM, Filadelfia, PA. Pág. 64-71.



Bajpai, M., Seth, S., 2000. Uso de Aceites No Convencionales en Recubrimientos de Superficie: Mezclas de Resinas Alquídicas con Ésteres de Epoxy, Vol. 29, pág. 82-87.

Botros, M.G., 1997. Mejorando el comportamiento del flujo frío de combustibles diesel, Artículo SAE 972899.

Chras, D., 1997. Mercado del Tabaco Griego: preparación para el futuro. Tobacco-International 199(1), 40-42

Demirba, A., 1998. Propiedades del combustible y cálculo de valores de calentamiento más altos de aceites vegetales. Combustible 77 (9/10), 1117-1120. Especificaciones Biodiesel Europeas, 2001. prEN 14214.

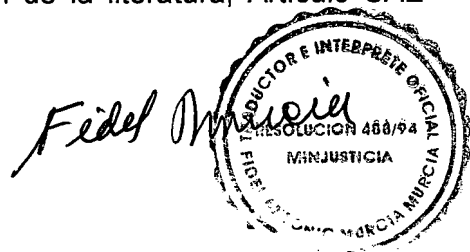
Goering, E., Schwab, W., Daugherty, J., Pryde, H., Heakin, J., 1982. Propiedades de combustible de once aceites vegetales. Trans. ASAE 25, 1472-1483.

Graboski, M.S., McCornick, R.L., 1998. Combustión de aceites grasos y vegetales derivados de combustibles en motores diesel. Prog. Energy Combust. Sci. 24, 125-164.

Centro Nacional del Tabaco de Grecia, 2000. Unión Europea 2848/98, (en Grecia)

Kuljuka, T., Savela, K., Peltonen, K., Rantanen, L., Mikonnen, S., 1998. Efecto de la reformulación de combustible en las emisiones de partículas diesel – aplicación de aducto DNA, Artículo SAE 982650.

Lee, R., Pedley, J., Hobbs, C.H., 1998. Calidad de combustible sobre las emisiones diesel de servicio pesado: revisión de la literatura, Artículo SAE 982646.



Marshall, W., Leon, G., Howell, S., 1995. Evaluaciones de las emisiones de escape del motor de un Cummins L10E cuando se alimentan con mezcla de biodiesel, Artículo SAE 952363.

Masjuki, H., Zaki, A.M., Sapuan, S.M., 1993. Éster metílico de aceite de Palma como combustible diesel alternativo. En: Combustibles para Motores Diesel Industriales y para Automotores. Institución de Ingenieros Mecánicos, Londres, pág 129.

Nikanjan, M., 1993. Desarrollo del primer combustible diesel alternativo de California certificado CARB, Artículo SAE 930728.

Papageourgiou, B., Zlatanos, S., Mellidis, A., 1996. Técnicas de laboratorio químico orgánico. Publicaciones Paratiritis, Pág 57-68.

Reece, D., Peterson, S.L., 1993. Reporte de progreso Idaho sobre prueba de carretera con aceite vegetal como combustible diesel. En: Procedimientos de la Primera Conferencia de Biomasa de las Américas, Laboratorio Nacional de Energías Renovables, 30 de Agosto – 2 de Septiembre, Pág 139.

Ryan, T.W., Mason, R.L., Passavant, G.W., Bond, T.J, 2000. Programa HDEWG EPA – Programa de Combustible de Prueba, Artículo SAE 2000-01-1857.

Schmidt, K., Gepren, V.P., 1996. El efecto de la composición de combustible diesel en la combustión y las emisiones diesel, Artículo SAE 961086.

Shafer, A., 1994. Investigación biodiesel – Mercedes Benz – política de garantía, Presentado en la comercialización del biodiesel: Establecimiento de garantías de motor, Universidad del Centro Nacional de Idaho para Tecnología de Transporte Avanzado, Pág 125-141.



Srivastana, A., Prased, R., 1999. Combustibles diesel basados en Triglicéridos, Energía Renovable y Sostenible revisiones 4, pág. 115-119.

Stavinoha, L.L., Howell, S., 1999. Posibles métodos analíticos para mezclas de biodiesel de estabilidad y biodiesel, Artículo SAE 1999-01-3520.

Stournas, S., Lois, E., Zannikos, F., 1997. Técnicas de Tecnología de Combustibles y Lubricantes. Publicaciones NTUA, Pág 101-108 En Grecia.

Thomopoulos, C., 1986. Ciencia y Tecnología Alimentaria, Publicaciones NTUA, Pág 57-68.

Departamento de Agricultura de Los Estados Unidos, 2001. Tabaco: Mercados y Comercio Mundial, disponible en <http://ffas.usda.gov/tobacco/circular/2011/0106/index.htm>.

Walsh, M.P., 1998. Tendencias globales en el control de emisiones diesel, Artículo SAE 980186.





ELSEVIER

Industrial Crops and Products 16 (2002) 1–9

INDUSTRIAL CROPS
AND PRODUCTS
AN INTERNATIONAL JOURNAL

www.elsevier.com/locate/indcrop

Tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: physical and chemical properties

P.N. Giannelos, F. Zannikos, S. Stournas, E. Lois *, G. Anastopoulos

Department of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, Iroon polytechniou 9, Athens 157 80, Greece

Accepted 19 December 2001

Abstract

Tobacco seed is a byproduct of tobacco leaves production in Greece. This oil seed was evaluated in the present study, as a renewable and potential source of energy. Successive tobacco seed oil extraction indicated that almost 38% of the seed was oil. The major constituents observed by GC analysis were linoleic acid (18:2), oleic acid (18:1) and palmitic acid (16:0). The physical, chemical and fuel related properties of tobacco seed oil were investigated in this work. These properties were comparable to those of other vegetable oils and to current European specifications for automotive diesel fuel. This study suggests that this non edible oil may be an appropriate substitute for diesel fuel. The environmental advantages of tobacco seed oil as a fuel can be exploited for specific niche markets such as inner city vehicles or tractors. On the other hand, tobacco seed oil as a fuel represents one possible hope for the future of EU tobacco agriculture. © 2002 Published by Elsevier Science B.V.

Keywords: Tobacco seed oil; Solvent extraction; Physical properties; Fuel properties; Fatty acid composition

1. Introduction

Agricultural oils, in raw or chemically modified forms, have the potential to substitute a fraction of petroleum distillates and petroleum based petrochemicals in the near future. Diesel boiling range material is of particular interest because it has been shown to significantly reduce particulate emissions relative to petroleum diesel. Recent studies indicate that the cetane number, aromatic

content and type, sulfur content, distillation temperature, and density are important factors for emission control (Kuljuka et al., 1998; Lee et al., 1998; Ryan et al., 2000). Reduction in the aromatic content and/or the removal of heavy fractions, or the use of lighter fuel are considered to be effective for this purpose (Walsh, 1998).

The demand for petroleum-derived fuels is changing. For gasoline and middle distillates including diesel fuel, it is increasing but with a sharp decrease for heavy fuels. It is thus difficult to reduce the aromatic content and heavy fraction in diesel fuel to meet the needs (Nikanjan, 1993). The production of economically viable clean fuel will remain a challenge in the years to come.

* Corresponding author. Tel.: +30-1-7723-190; fax: +30-1-6197-750.

E-mail address: elois@orfeas.chemeng.ntua.gr (E. Lois).

The development of biomass derived substitutes for diesel fuel is a possible attractive outlet, as it could help improve diesel fuel quality. Among the different possible sources, diesel fuels derived from vegetable oils present a promising alternative to substitute diesel fuels (Marshall et al., 1995; Schmidt and Gepren, 1996). There are more than 350 oil bearing crops identified, among which only sun flower, safflower, soybean, cotton seed, rapeseed and peanut oils are considered as potential alternative fuels for diesel engines. These organic seed oils are better than diesel fuel in terms of sulfur content, flash point, aromatic content and biodegradability (Goering et al., 1982).

Vegetable oils have different chemical structures to petroleum-based diesel fuels. Up to three fatty acids are linked to a glycerol molecule with ester linkages. The basic constituent of vegetable oils is triglyceride. Vegetable oils comprise 90–98% triglycerides and small amounts of mono- and diglycerides. With few exceptions, the fatty acids from which the vegetable oils are derived, are all straight-chain compounds ranging in size from 3 to 18 carbons (Thomopoulos, 1986).

Many nations depending upon their climate and soil conditions, are looking into different vegetable oils as alternative for diesel fuels. Greece, a major international tobacco producer, is one of the eleven countries which grow approximately 80% of the world's tobacco. World unmanufactured tobacco production for 2000 was estimated at 7 722 327 t (United States Department of Agriculture, 2001) while the 2000 crop in Greece was estimated at 123 704 t (Greek National Center of Tobacco, 2000).

Tobacco seed (Fig. 1) is a by-product of tobacco leaves production in Greece and in other countries. The seeds of the tobacco plant are very small in size, but they come in an extremely large quantity per plant (Chras, 1997). They can be preserved for a long time if they are stored in dry conditions, resistant to rather high humidity at ordinary temperatures, and have a strong shell. The tobacco seeds endosperm contains thin walled cells, rich in oil. The oil extracted from tobacco seed is a non edible oil, and the physical as well as the chemical properties of this oil are not available in the literature. The objectives of

this investigation were to analyze various fuel-related properties of tobacco seed oil. These properties were compared to those of other vegetable oils and to the Greek requirements for petroleum oils.

2. Materials and methods

2.1. Extraction procedure—tobacco seed oil content

The oil of tobacco seeds was extracted using hexane solvent and the oil was separated from the solvent using a rotary vacuum evaporator. The seeds were dried for 1 h at 60–70 °C, grounded and extracted. The extract was concentrated using the rotary vacuum evaporator, dried at 60 °C and weighed. Yield was calculated as calculated on dry weight basis (Papageorgiou et al., 1996).

A representative ground sample of tobacco seeds was weighed and the oil was extracted using petroleum ether according to the GIPSA (Grain Inspection Packers and Stockyards Administration of United States department of agriculture) standard operating procedures. Upon completion of extraction process, the oil content of the ground sample was calculated. The method used was a modification of the AOCS (American Oil Chemical Society) (AOAC, 1995) official method Ac 3-44, where we kept the soxtec device tempera-

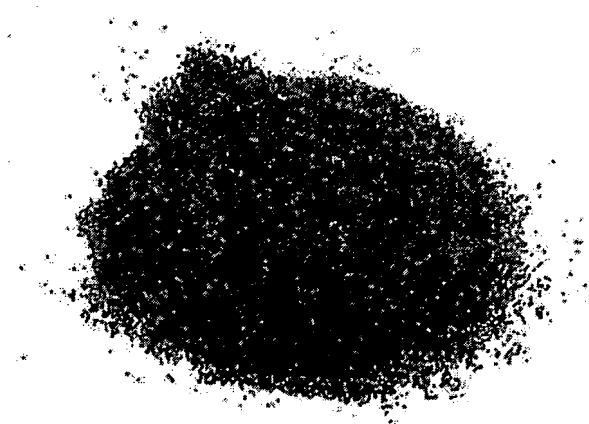


Fig. 1. Tobacco seeds.

ture at 120 °C instead of 100 °C and the extraction process lasted 15 min while the distillation process lasted 45 min.

2.2. Tobacco seed oil fatty acid composition

Fatty acid composition of tobacco seed oil was determined by GC analysis. A Hewlett Packard 5890 series II Gas Chromatograph, with a SP2340 type column (Supelco company) 60 m long and split–splitless injector, was used. The inside diameter was 0.25 mm and film thickness was 0.20 µm. The detector was a FID. An automatic sampler was attached to the HP 5890 GC to automate sample introduction. The sample (tobacco seed oil) amount injected was 0.5 µl. The temperature of GC injector was 230 °C. Helium was used as a carrier gas. The flame ionization detector temperature was 230 °C. The oven temperature was kept at 175 °C for 31 min. After that, the oven was heated with heat ratio 3.0 °C/min to 220 °C. The oven temperature was constant for 5 min. The final temperature was 220 °C. The fatty acids of tobacco seed oil were identified and quantified using the external larodan standard 905518.

2.3. Physical and chemical properties of tobacco seed oil

The tobacco seed oil was analysed for physical and chemical properties using standard procedures shown in Table 1. However, as too low amounts of tobacco seed oil were available for determination of cetane number using the standard method a calculated cetane number was established according to Goering et al. (1982).

3. Results and discussion

The yield of tobacco seed oil ranged from 36.2 to 41.4% (average $L_1 = 38.8\%$) on dry weight basis, using soxhlet column hexane extraction, and $L_2 = 33.4\%$, using soxtec apparatus petroleum ether extraction. These values indicate that tobacco seeds are rich in oil.

Fig. 2 presents the GC chromatograph of the tobacco seed oil. The total saturated and unsatu-

Table 1
Determination of physical and chemical properties using standard methods

Physical and chemical properties	Standard method	Unit
Density	ASTM D4052-91 (1995c)	g/ml
Iodine value	AOAC CD1-25 1993	Centigrams I/g oil
Saponification value	AOAC CD3-25 1997	Mg KOH/g oil
Energy content	ASTM D2015-85 (1988)	MJ/kg
Cloud point	ASTM D2500-91 (1995b)	°C
Pour point	ASTM D97-93 (1995f)	°C
Flash point	ASTM D93-94 (1995e)	°C
Cetane number	ASTM D613 (1979)	–
Kinematic viscosity	ASTM D44 (IP 71)	cSt at 40 °C
Sulfur content	ASTM D5453-93 (1995d)	wt. %
Ash	ASTM D482-91 (1995a)	wt. %

rated fatty acid compositions of tobacco seed oil were 14.8 and 85.2%, respectively (Table 2). Linoleic (18:2) and oleic (18:1) were the two most abundant unsaturated acids (69.49 and 14.54%, respectively).

Although only acids with an even number of carbons occur naturally, tobacco seed oil contains a little amount of heptadecanoic (17:0) and heptadecenoic (17:1) acids (0.10 and 0.05%, respectively).

A summary of the physical and chemical properties of tobacco seed oil (soxhlet column hexane extracted) and other seed oils used for biodiesel production (Srivastana and Prased, 1999), as well as the Greek requirements for automotive diesel fuel (Stournas et al., 1997), are listed in Table 3. Table 4 presents some physical and chemical properties of tobacco seed oil from another study (Bajpai and Seth, 2000). Most of the values were similar to the ours, except for the Iodine value and the Palmitic content, indicating that differences for the same raw material may exist in different geographic regions.

In the course of our experiments, the density of the tobacco seed oil was found 0.9175 kg/l. Although the density of the tobacco seed oil was similar to those of the other vegetable oils, it was higher than the European regulations, by which the Greek specifications comply, stating that the density of the diesel fuels after the beginning of the year 2000, must lie in the range 0.820–0.845 kg/l. Therefore, volumetric metering of tobacco seed oil (as in the unit injectors used in modern diesel engines) results in the delivery of greater mass of fuel. However, vegetable oils have a lower energy content on both the volumetric and a mass basis. Therefore, although a unit injector might deliver a larger mass of fuel, the actual energy delivered is less than conventional diesel fuels.

Iodine number is a measure of the degree of unsaturation of the fuel. Mercedes Benz experience suggests that fuel with iodine number greater than 115 is not acceptable because of excessive carbon deposits (Shafer, 1994). The iodine value of most

vegetable oils was within the range of 105–130. The iodine value of tobacco seed oil is greater than that of the other oils, and the maximum value set by the European Union regulations, setting a maximum value for Iodine Number at 120. This result was expected, since it was based on the greater degree of unsaturation of this oil. Unsaturation in the fatty acid chain is the main source of instability in vegetable oils (Stavinoha and Howell, 1999). If two or more double bonds are present, they have a mutually activating effect. The metals and elastomers in contact with vegetable oils during storage can also impact stability. Oxidation leads to the formation of hydroperoxides, which can attack elastomers or polymerize to form insoluble gums. Removal of the unsaturation by hydrogenation leads to a worsening of cold flow properties (Graboski and McCormick, 1998). Research must be directed at additives that can act to stabilize the unsaturated bonds in vegetable oils to obtain an acceptable stability.

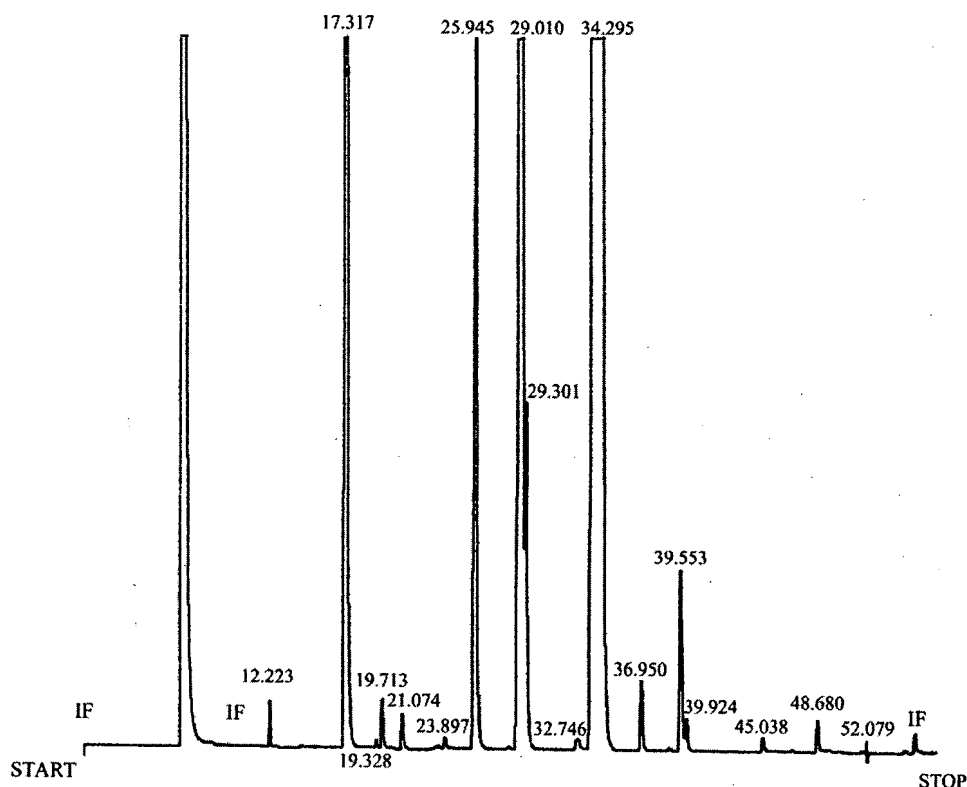


Fig. 2. GC chromatogram of the tobacco seed oil.

Table 2
Fatty acid composition of tobacco seed oil

Number of carbons	Fatty acid	Chemical structure	Weight %
8	Caprylic [Carboxylic acid C ₈]	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	<0.01
10	Capric [Carboxylic acid C ₁₀]	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	<0.01
12	Lauric [Carboxylic acid C ₁₂]	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	<0.01
14	Myristic [Carboxylic acid C ₁₄]	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	0.09
16	Palmitic [Carboxylic acid C ₁₆]	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	10.96
16	Palmitoleic [<i>cis</i> -9-Hexadecanoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH = CH(CH ₂) ₇ COOH	0.20
17	Heptadecanoic [carboxylic acid c ₁₇]	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	0.10
17	Heptadecenoic [<i>cis</i> -9-Heptadecanoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₆ CH = CH(CH ₂) ₇ COOH	0.05
18	Stearic [carboxylic acid c ₁₈]	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	3.34
18	Oleic [<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH = CH(CH ₂) ₇ COOH	14.54
18	Linoleic [<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH = CH) ₂ (CH ₂) ₇ COOH	69.49
18	Linolenic [<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid]	CH ₃ (CH ₂ CH = CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOH	0.69
18	Elaidic [<i>trans</i> -9-Octadecenoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH = CH(CH ₂) ₇ COOH	0.02
18	C18:2 [<i>trans,trans</i> -9,12-Octadecadienoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH = CH) ₂ (CH ₂) ₇ COOH	0.04
18	C18:3 [<i>trans,trans,trans</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid]	CH ₃ (CH ₂ CH = CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOH	0.03
20	Eicosanoic [carboxylic acid C ₂₀]	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	0.25
20	Eicosenoic [<i>cis</i> -10-eicosenoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₈ CH = CH(CH ₂) ₈ COOH	0.13
22	Behenic [carboxylic acid C ₂₂]	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	0.12
22	Erucic [<i>cis</i> -13-docosanoic acid]	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH = CH(CH ₂) ₁₁ COOH	<0.01
24	Lignoceric [carboxylic acid C ₂₄]	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	0.04

The saponification value of the tobacco seed oil (193 mg KOH/g) was within the saponification value range of all vegetable oils. This value reflected the average length of the fatty acid chain of this oil.

The HHV of tobacco seed oil, was calculated using the Demirba equation (Demirba, 1998), showed a difference of 0.032% from the measured value. The energy content of this oil was 39.4 MJ/kg. This value was almost the same as the other vegetable oils. The energy contents of most vegetable oils are approximately 12% lower than that of the automotive diesel fuel used in Greece.

Cold flow properties characterize the behaviour of the fuel at low temperatures. Inadequate cold flow performance may cause serious problems in colder regions, especially in winter. As a consequence, it is important to guarantee good cold flow behaviour either due to the inherently good cold flow performance of the fuel or by adding suitable additives. Cold flow improver additives can de-

crease the size, or inhibit the formation of the wax crystallites formed upon cooling the fuel and thus lower the temperature at which wax plugging becomes a problem (Botros, 1997). One of the disadvantages of the commonly used seed oils is the inadequate cold flow performance during winter (Graboski and McCormick, 1998). According to our experiments when the tobacco seed oil was compared to the other vegetable oils, it had the lowest cloud point of – 7.8 °C. Moreover, its pour point was – 14 °C, which is within the range of 12 to – 31 °C that (Goering et al., 1982) reported for vegetable oils.

Flash point is a measure of the temperature to which a fuel must be heated so that the mixture of vapor and air above the fuel can be ignited. Compared to the other vegetable oils, tobacco seed oil has the lowest flash point of 220 °C. All vegetable oils have relatively high flash points, so they are considered to be safe fuels under normal

Table 3
Properties of tobacco oil and other vegetable oils—Greek requirements

Vegetable oil	Kinematic viscosity at 40 °C (mm ² /s)	Cetane number	Energy content (MJ/kg)	Cloud point (°C)	Pour point (°C)	Flash point (°C)	Density (kg/l)	Sulfur (wt.%)	Saponification value (mg KOH/gr)	Iodine number	Ash (%)
Corn	34.9	37.6	39.5	−1.1	−40.0	277	0.9095	0.010	187–195	122.6	0.01
Cottonseed	33.5	41.8	39.5	1.7	−15.0	234	0.9148	0.010	189–198	105.7	0.01
Peanut	39.6	41.8	39.8	12.8	−6.7	271	0.9026	0.010	187–196	–	0.005
Rapeseed	37.0	37.6	39.7	−3.9	−31.7	246	0.9115	0.010	168–181	130.0	0.054
Sesame	35.5	40.2	39.3	−3.9	−9.4	260	0.9133	0.010	187–195	106.6	<0.010
Soya bean	32.6	37.9	39.6	−3.9	−12.2	254	0.9138	0.010	189–195	112.5	<0.010
Sunflower	33.9	37.1	39.6	7.2	−15.0	274	0.9161	0.010	188–194	125.5	<0.010
Tobacco oil	27.7	38.7	39.4	−7.8	−14.0	220	0.9175	0.006	193	135.0	0.008
European requirements (automotive diesel fuel)	2–4.5	51 (min)	–	–	–	56 (min)	0.820–0.845	0.035 (max)	–	120	0.01 (max)

Table 4

Comparison of physical and chemical data of Tobacco seed oil for two countries

	Tobacco seed oil (Bajpai and Seth, 2000)	Tobacco seed oil (this work)
Iodine value	145	135
Saponification value	190.9	193
Linoleic acid, wt.%	70.0	69.49
Oleic acid, wt.%	16.0	14.54
Stearic acid, wt.%	5.0	3.34
Palmitic acid, wt.%	3.0	10.96

conditions. The flash point of tobacco seed oil has been found to be far greater than that of the automotive diesel fuel used in Greece.

The cetane number of the fuel is a measure of its ignition delay with higher cetane numbers indicating shorter time between the initiation of fuel injection and ignition, a desirable property in diesel engine fuel. The calculated cetane number of tobacco seed oil was 38.7. This was within the typical cetane number range of all vegetable oils. The cetane numbers of vegetable oils increase with esterification. After this process, the cetane number could become greater than that of the European requirement of a minimum 51, for automotive diesel fuels.

The viscosity of a liquid fuel is important to its flow through pipelines, injector nozzles, orifices and for atomization of fuel in the cylinder (Goering et al., 1982). The major problem associated with the use of pure vegetable oils as fuels, for diesel engines is caused by high fuel viscosity in compression ignition. The vegetable oils were all extreme viscous, with viscosities ranging 10–20 times greater than conventional diesel fuels (Reece and Peterson, 1993). The kinematic viscosity of vegetable oils, used for biodiesel production, varies in the range of 30–40 cSt at 40 °C. Tobacco seed oil was less viscous (27.7 cSt) compared to the other vegetable oils. Transesterification, pyrolysis or dilution would reduce its viscosity and improve its per-

formance in a diesel engine (Masjuki et al., 1993). After any of these processes, the Greek requirement of maximum 4.5 cSt viscosity could be met by tobacco seed oil.

The sulfur content of tobacco seed oil, as well as the other vegetable oils, was less than 0.035 wt.%, which is the limit for automotive diesel fuel in Greece. Sulfur compounds cause environmental pollution from their combustion products and they also are naturally corrosive and cause several physical problems to engine parts (Ryan et al., 2000).

Ash content of tobacco seed oil was less than 0.004 g/50 g of dry sample (< 0.01 wt.%, which is the Greek requirement). It was concluded that this ash content was low enough so as not to cause any problems when used, as fuel in diesel engines.

A timely question as to which vegetable oil could be used for biodiesel production, is a combination of its availability and cost of the raw material on the one hand, and specifications on the other. Latest European Biodiesel specifications (2001), state explicitly the minimum and maximum values the vegetable oils must have, before they could be used. If this is combined with the fact that biodiesel use in automotive and heating diesel becomes obligatory in the European Union after the year 2005, and in gradual proportions of up to 5% by volume by the year 2010, one is left with all option open to use various vegetable oil materials, to satisfy the local needs.

4. Conclusions

1. The tobacco seed was found to be rich in oil.
2. The physical, chemical and thermal fuel properties of tobacco seed oil, obtained in the present research compared well with other vegetable oils.
3. The viscosity of tobacco seed oil prohibits its direct use as an alternative fuel in diesel engines, but it could be used in blends with automotive diesel, or after catalytic transesterification of its triglycerides with alcohols,

forming monoalkyl esters of long-chain fatty acids.

4. The use of tobacco seed byproduct, for tobacco seed oil or tobacco seed oil biodiesel production, could be an attractive alternative application of the existing tobacco crops in Greece for new markets
5. The latest European Union mandate, obliges all member states that after the year 2005 biodiesel should be used into the automotive and heating diesel, and in growing proportions from 2% by volume and up to 5% by volume by the year 2010, is a strong incentive for tobacco growing countries, to further study the tobacco seed oil as a possible venue for biodiesel production. Studies are necessary to establish the engine and boiler emissions, before it is introduced into the market.

Acknowledgements

The authors wish to thank the members of the fish nutrition and pathology laboratory, of the Greek National Centre of Marine Research for their assistance during the Soxtec apparatus experiment.

References

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1993. Section C: Commercial Fats and Oils, American Oil Chemists Society (AOCS) official method Cd 1–25 for Iodine Value. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington 2000.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1997. Section C: Commercial Fats and Oils, American Oil Chemists Society (AOCS) official method Cd 3–25 for Saponification Value. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington 2000.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Section C: Commercial Fats and Oils, American Oil Chemists Society (AOCS) official method Ac-3–44 for oil content. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington 2000.
- ASTM, 1979. Standard Test Method for Ignition Quality of Diesel Fuels by the Cetane Method, Designation: D 613, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.04, ASTM, Philadelphia, PA.
- ASTM, 1988. Standard Test Method for Gross Calorific Value of Coal and Coke by the Adiabatic Bomb Calorimeter, Designation: D2015–85, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.02, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 238–243.
- ASTM, 1995a. Standard Test Method for Ash from Petroleum Products, Designation: D482-91, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.01, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 198–199.
- ASTM, 1995b. Standard Test Method for Cloud Point of Petroleum Products, Designation: D2500-91, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.01, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 840–842.
- ASTM, 1995c. Standard Test Method for Density and Relative Density of Liquids by Digital Density Meter, Designation: D4052-91, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.02, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 684–687.
- ASTM, 1995d. Standard Test Method for Determination of Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Motor Fuels and Oils by Ultraviolet Fluorescence, Designation: D5453-93, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.03, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 603–608.
- ASTM, 1995e. Standard Test Method for Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester, Designation: D93-94, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.01, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 31–44.
- ASTM, 1995f. Standard Test Method for Pour Point of Petroleum Products, Designation: D97-93, Annual Book of ASTM Standards, vol. 05.01, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 64–71.
- Bajpai, M., Seth, S., 2000. Use of Unconventional Oils in Surface Coatings: Blends of Alkyd Resins with Epoxy Esters, vol. 29, pp. 82–87.
- Botros, M.G., 1997. Enhancing the cold flow behavior of diesel fuels, SAE Paper 972899.
- Chras, D., 1997. Greek tobacco market: preparing for the future. Tobacco-International 199 (1), 40–42.
- Demirba, A., 1998. Fuel properties and calculation of higher heating values of vegetable oils. Fuel 77 (9/10), 1117–1120.
- European Biodiesel Specifications, 2001. prEN 14214.
- Goering, E., Schwab, W., Daugherty, J., Pryde, H., Heakin, J., 1982. Fuel properties of eleven vegetable oils. Trans. ASAE 25, 1472–1483.
- Graboski, M.S., McCormick, R.L., 1998. Combustion of fat and vegetable oils derived fuels in diesel engines. Prog. Energy Combust. Sci. 24, 125–164.
- Greek National Center of Tobacco, 2000. European Union 2848/98, (in Greek).
- Kuljuka, T., Savela, K., Peltonen, K., Rantanen, L., Mikonnen, S., 1998. Effect of fuel reformulation on diesel particulate emissions—application of DNA adduct test, SAE Paper 982650.
- Lee, R., Pedley, J., Hobbs, C.H., 1998. Fuel quality impacted on heavy-duty diesel emissions: A literature review, SAE Paper 982646.
- Marshall, W., Leon, G., Howell, S., 1995. Engine exhaust emissions evaluations of a Cummins L10E when fueled with biodiesel blend, SAE Paper 952363.
- Masjuki, H., Zaki, A.M., Sapuan, S.M., 1993. Methyl ester of palm oil as alternative diesel fuel. In: Fuels for Automotive and Industrial Diesel Engines. Institution of Mechanical Engineers, London, p. 129.

- Nikanjan, M., 1993. Development of the first CARB certified California alternative diesel fuel, SAE Paper 930728.
- Papageorgiou, B., Zlatanov, S., Mellidis, A., 1996. Organic chemistry laboratory techniques. Paratiritis Publications, pp. 57–68.
- Reece, D., Peterson, S.L., 1993. Progress report Idaho on-road test with vegetable oil as a diesel fuel. In: Proceedings of First Biomass Conference of the Americas, National Renewable Laboratory, 30 August–2 September, p. 139.
- Ryan, T.W., Mason, R.L., Passavant, G.W., Bond, T.J., 2000. EPA HDEWG Program—Test Fuel Program, SAE Paper 2000-01-1857.
- Schmidt, K., Gepren, V.P., 1996. The effect of biodiesel fuel composition on diesel combustion and emissions, SAE Paper 961086.
- Shafer, A., 1994. Biodiesel research—Mercedes Benz—warranty policy, Presented at commercialization of biodiesel: Establishment of engine warranties, University of Idaho National Center for Advanced Transportation Technology, pp. 125–141.
- Srivastana, A., Prasad, R., 1999. Triglycerides based diesel fuels, *Renewable and Sustainable Energy reviews* 4, pp. 115–119.
- Stavinoha, L.L., Howell, S., 1999. Potential analytical methods for stability biodiesel and biodiesel blends, SAE Paper 1999-01-3520.
- Stournas, S., Lois, E., Zannikos, F., 1997. Fuels and Lubricants Technology Techniques. NTUA Publications, pp. 101–108 In Greek.
- Thomopoulos, C., 1986. Food Science and Technology. NTUA Publications, pp. 57–68.
- United States Department of Agriculture, 2001. Tobacco: World Markets and Trade, Available from <http://ffas.usda.gov/tobacco/circular/2001/0106/index.htm>.
- Walsh, M.P., 1998. Global trends in diesel emissions control, SAE Paper 980186.