

TRIANA, URIBE & MICHELSEN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-111673- -00009-0000

Fecha: 2013-05-17 16:35:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 83

MINISTERIO DE COMERCIO INDUSTRIA Y TUR
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMER
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E.

S.

D.

REFERENCIA : SOLICITUD DE REGISTRO DE LA PATENTE
"MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA
PLANTA DE TABACO MUTAGENIZADA DE
ALTA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE
SEMILLAS".

EXPEDIENTE No. : 09-111673

CODIGO : 01-01-08

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 la sociedad **AEP-ADVANCED ECOPOWER PATENTS S.A.**, existente y organizada conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Locarno, Suiza, respetuosamente manifiesto a usted que interpongo recurso de **REPOSICIÓN** en contra de la Resolución No. 14695 de fecha 1 de abril de 2013, expedida por la Dirección de Nuevas Creaciones de la Superintendencia de Industria y Comercio, mediante la cual niega el registro de la patente arriba indicada, de conformidad con los hechos y los argumentos que se exponen a continuación:

1. HECHOS

- 1.1. La sociedad **AEP-ADVANCED ECOPOWER PATENTS S.A.** solicitó el día 08 de octubre de 2009, el registro de la patente de la referencia, como entrada en fase nacional del Tratado de Cooperación de Patentes.
- 1.2. La solicitud de registro de la patente fue publicada en la Gaceta de la Propiedad Industrial No. 623, sin que **ninguna** oposición le fuera presentada por parte de terceros.
- 1.3. Una vez cumplido el requisito de solicitud de examen de patentabilidad, el Despacho expidió el Oficio de fondo No. 16515 de fecha 14 de septiembre de 2012, al cual se le dio respuesta oportuna mediante memorial de 13 de diciembre de 2012 y se limitó el pliego de reivindicaciones a las cláusulas 1 a 19 presentadas junto a dicho memorial.

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



2. ALEGATOS DE LA SOCIEDAD AEP-ADVANCED ECOPOWER PATENTS S.A.

2.1. INCORRECTA INTERPRETACIÓN DEL ARTÍCULO 20

De acuerdo con el considerando quinto de la Resolución No. 14695, la Superintendencia de Industria y Comercio niega las reivindicaciones 1, 2 y 8 a 10, contenidas en los folios 169 a 172, porque en su concepto no cumplen los requisitos de patentabilidad por cuanto están referidas a métodos para la producción de plantas, donde dichos métodos contienen pasos que comprenden procesos esencialmente biológicos, como permitir que las semillas germinen y seleccionar la progenie con las características deseadas, indicando que dicha materia no puede ser objeto de patente de conformidad con lo dispuesto en el literal c) del artículo 20 de la Decisión 486, en razón a que allí se establece que no serán patentables: *“los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos.”*

Respetuosamente el solicitante se permite discrepar de la interpretación que en esta ocasión se ha realizado del artículo 20, y para ello se permite citar el artículo 20 de la Decisión 486 establece:

“Artículo 20.- No serán patentables:

- a) las invenciones cuya explotación comercial en el territorio del País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger el orden público o la moral. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria al orden público o a la moral solo debido a la existencia de una disposición legal o administrativa que prohíba o que regule dicha explotación;*
- b) las invenciones cuya explotación comercial en el País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger la salud o la vida de las personas o de los animales, o para preservar los vegetales o el medio ambiente. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria a la salud o la vida de las personas, de los animales, o para la preservación de los vegetales o del medio ambiente sólo por razón de existir una disposición legal o administrativa que prohíba o que regule dicha explotación;*



- c) *las plantas, los animales y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos*;
- d) *los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a los seres humanos o a animales.* ” (EL SUBRAYADO ES NUESTRO)

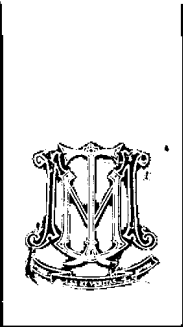
De la lectura cuidadosa del artículo 20 es evidente que la citada Decisión excluye de la patentabilidad únicamente a las plantas, los animales y los procedimientos esencialmente biológicos de obtención de vegetales o animales, dicho artículo no excluye los procedimientos no biológicos o microbiológicos, como el método que se reclama mediante la presente invención.

Sumado a lo anterior, dado que la decisión guarda silencio sobre la definición de lo que constituye un procedimiento esencialmente biológico y el examinador ha basado su decisión en una interpretación personal de la misma, la cual resulta errada, como se demuestra a continuación:

2.1.1. Claridad sobre los métodos reclamados:

Un análisis detallado de la redacción de las reivindicaciones 1 y 2 muestra que hay al menos dos etapas esenciales de carácter técnico, que no pueden confundirse con los métodos de cruzamiento y selección clásicas, que son esenciales para la introducción o modificación de un rasgo en el genoma de la planta producida, y que están dentro del proceso completo de cruzamiento y selección. En procura de hacer más notable los pasos realizados por el hombre, a continuación se transcriben las reivindicaciones 1 y 2, y se subrayan las etapas de carácter técnico que no son esencialmente biológicas:

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

Como se desprende de la lectura de los párrafos anteriores, todas las reivindicaciones comprenden al menos dos pasos de carácter técnico que introducen un nuevo rasgo en el genoma de la planta, lo que resulta en el fenotipo reclamado: producción de una cantidad



extremadamente alta de semillas. Debe ser claro que tales pasos no son anteriores ni posteriores a la fase de cruzamiento sexual y selección, sino que ellos están definitivamente dentro de los pasos de cruce y selección, así que contribuyen a los resultados técnicos, de lo contrario la planta deseada no se puede obtener.

Un análisis detallado de las reivindicaciones muestra que el cruzamiento comienza en la etapa a) o a ') y que la etapa a) o a') requiere: un primer cruce entre dos parentales seleccionados y una subsecuente mutación de las semillas producidas a partir de los parentales, ya sea por mutagénesis aplicada directamente sobre la semilla o por el retrocruzamiento de F1 y la inducción de anfidiploides mediante tratamiento con colchicina del ápice vegetativo de las plantas producidas por dichos cruces.

Como también se indica en la solicitud, las plantas de la invención han sido producidas a través de la selección de plantas de tabaco, generadas a partir de la utilización de técnicas de mutagénesis física y mutagénesis somática in vitro, sobre los cruces obtenidos también entre diferentes especies (en este caso, seguido por la inducción de anfidiploides con el fin de duplicar el número completo de los cromosomas, permitiendo de este modo que ocurra una meiosis balanceada).

En resumen, de acuerdo con la descripción de la invención, la mutagénesis puede ser inducida por técnicas de tratamiento químico y/o físico de las semillas de tabaco, o también por técnicas de mutagenesis in vitro para la inducción de mutantes somaclonales.

Como ya fue mostrado en los datos técnicos proporcionados junto con el memorial de 13 de diciembre de 2012, el evento mutacional es, como se indica de forma inequívoca a lo largo de toda la solicitud, inducido por técnicas de tratamiento químico y/o físico. Para una persona versada en la materia es conocido que los métodos para inducir mutaciones artificiales se basan en el uso de agentes químicos y físicos. La mayoría de los mutágenos químicos son agentes alquilantes y azidas, mientras los mutágenos físicos incluyen en particular radiaciones electromagnéticas, como rayos γ , rayos X, la luz UV y la radiación de partículas, como neutrones rápidos y térmicos, partículas β y α .

Además del paso b) del proceso de cruzamiento y selección, el proceso reivindicado comprende el paso c) donde se permite la germinación de las plantas seleccionadas en el paso b) y las plantas son regeneradas a partir de callos del mesófilo de la hoja inducidos in vitro en presencia de fitohormonas, y las plantas regeneradas que mantienen las características seleccionadas en el paso b) en las generaciones R0-R2 son seleccionadas nuevamente.



Dado que el paso de la "regeneración in vitro a partir del callo del mesófilo de la hoja" no puede ser confundido con un paso de cruzamiento/selección, se puede afirmar que también c) comprende una etapa adicional de carácter técnico, que ayuda a la obtención de plantas, que han sido regeneradas a partir de células y que tienen incluidos en sus genomas las características de interés (líneas puras).

El último paso del proceso reclamado es una selección de control adicional de las plantas portadoras de las características deseadas en campo abierto.

En este orden de ideas, el método reclamado comprende, como se discutió anteriormente, etapas técnicas llevadas a cabo por el hombre, las cuales tienen un impacto decisivo sobre el resultado obtenido **dentro** del proceso completo de cruzamiento sexual y selección. Dichas etapas tienen un carácter técnico toda vez que se requiere someter las plantas a mutagénesis química o física, sin la cual las plantas no producen una cantidad de semillas superiores a las reportadas en la literatura (por ejemplo, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000 kg por hectárea, cuando se cultivan en las condiciones establecidas en el experimento 1 de 100.000 plantas /ha o como se describe en la página 9, a una densidad de alrededor de 125.000 plantas/ha) y a la regeneración in vitro de las plantas seleccionadas, con el fin de obtener plantas que tienen integradas en sus genomas las características deseadas.

Como es claro a partir de los datos experimentales proporcionados en la respuesta anterior y en los anexos incluidos nuevamente, las plantas antes de la etapa de mutagénesis y regeneración no muestran las características de las plantas seleccionadas después de estos pasos. Así las cosas, estos datos evidencian que la etapa de mutagénesis es esencial para lograr la introducción de las nuevas características en el genoma y que el paso de la regeneración in vitro es esencial para la obtención de plantas que han fijado en sus genomas las características deseadas.

El hecho que el nuevo rasgo esté efectivamente integrado de forma estable en el genoma es asegurado mediante la etapa de regeneración y verificado por los siguientes pasos de selección, donde varias generaciones son monitoreadas para verificar que mantienen la nueva característica.

Como se reporta en la tabla 1, que reúne información sobre "*los mejores mutantes*", el solicitante ha obtenido varias plantas que tienen las propiedades deseadas mediante el método descrito y reivindicado en la presente solicitud.

Las plantas han sido obtenidas mediante el cruzamiento dentro de la misma especie o por cruces inter-especies y por el sometimiento de las semillas a mutagénesis química o física o al tratamiento del ápice vegetativo con agentes químicos (colchicina) para mutagénesis



somática in vitro y, posteriormente, regeneración de las plantas mutadas. Ambos procedimientos son conocidos por causar alteraciones en el ADN. Ciertas selecciones subsecuentes y pasos de cruce opcionales son llevados a cabo con el fin de identificar objetivamente las plantas mutadas que tienen el fenotipo deseado y de verificar la herencia de la misma.

Los datos experimentales proporcionados en este documento demuestran que la etapa de alteración del ADN es esencial para obtener el fenotipo de alta producción de semillas que no se puede lograr sin mutagénesis de la planta.

Los mutantes nombrados como pLT103 y pLT100 en la solicitud fueron obtenidos a partir del cruce inicial de hojas de variedades comerciales que tienen una producción máxima de aproximadamente 1000 kg de semillas/ha, (TC528, TC 531 y TC 542 tienen un promedio de producción de 850 kg semilla/ha), mientras que las plantas pLT104 (*N. tabacum* x *N. sylvestris*), pLT102 (*N. tabacum* x *N. quadrivalvis*) y pLT101 (*N. tabacum* x *N. tomentosiformis*), derivadas de parentales que producen menos de 500 kg de semillas/ha, con excepción de *N. tabacum*, fueron obtenidas por cruzamientos interespecíficos que generan plantas estériles (es decir, SIN SEMILLAS) y fueron sometidas a mutagénesis somática in vitro, mediante métodos de cultivo de embriones e inducción de poliploides por tratamiento con el mutágeno colchicina, dando lugar a las plantas reportadas en la tabla 1 que se presenta más adelante.

Los mutantes fueron seleccionados de acuerdo con los parámetros reivindicados y la selección final para verificar la productividad de las semillas fue hecha en invernadero en una parcela de 10 m², donde se calculó la densidad de las plantas en escala (12,5 plantas/m² equivalente a 125.000 plantas/ha) (1 ha = 10.000 m²).

Varios individuos con un fenotipo de alta producción de semilla fueron obtenidos y ejemplos de algunos de ellos se presentan en la tabla 1.

La tabla a continuación reporta la densidad de semillas por m² y el cálculo de la producción de semillas por hectárea (ha) de las plantas experimentales obtenidas mediante los métodos de las reivindicaciones 9 y 10, comparado también con las semillas de más alta producción por hectárea (ha) que habían sido reportadas en el estado de la técnica por Patel et al. 1998, también citado en el Reporte de Búsqueda Internacional.



TABLA 1.

CRUZAMIENTO	Densidad (planta/m2)	Semilla/planta (gramos)	Kg. de Semilla/ Ha	Método	Densidad (planta/m2)	Semilla/planta (gramos)	Kg. Semilla/ Ha	Nombre del Lab. de mutación
TC528xTC531	12.5	10.0	1250	Mutagenesis Química y Selección	12.5	45.97	5746	PLT-103
TC528xTC542	12.5	9.5	1187	Mutagenesis Química y Selección	12.5	35.61	4451	PLT-100
N. tabacum x N. sylvestris	12.5	0	0	Mutagenesis Somática in- vitro y Selección	12.5	34.69	4336	PLT-104
N. tabacum x N. quadrivalvis	12.5	0	0	Mutagenesis Somática in- vitro y Selección	12.5	32.76	4095	PLT-102
N. tabacum x N. tomentosiformis	12.5	0	0	Mutagenesis 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 MUTACION	12.5	6.8	850	

Por favor note que las mutaciones se definen como cambios heredables en el material genético no causados por segregación o recombinación (de hecho, la producción de semillas de las plantas antes de mutagénesis era o bien para la producción de semillas estándar para variedades de hoja, o la absoluta no producción en híbridos).

2.1.2. Análisis del método reivindicado y la exclusión del literal c) del artículo 20 de la Decisión 486.

Considerando la información anterior, es claro que el objeto de la invención es un proceso que comprende **cuatro pasos, de los cuales tres pasos a) b) y c) no ocurren en la naturaleza**, siendo así, no es posible afirmar que dicho método sea un procedimiento esencialmente biológico para la producción de plantas, como el solicitante lo ha manifestado varias veces, no solo en la solicitud sino en su respuesta a las observaciones de fondo. El método reivindicado de ninguna manera cae dentro de la materia que el artículo 20 literal c) excluye de patente.



El artículo 20c, es claro en indicar que “*No serán patentables:*” los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos”, dicho artículo de ninguna manera establece que no serán patentables los procedimientos **que comprenden** uno o más pasos que ocurran en la naturaleza, como es el caso del proceso reivindicado.

Siendo que la invención se refiere a un método caracterizado por comprender los 4 pasos señalados en la reivindicación 1, el examinador se equivoca al basar su decisión únicamente en el único paso que efectivamente es esencialmente biológico e ignorar el hecho que existen otros pasos que no pueden ser vistos como esencialmente biológicos, pues en la naturaleza no existe un proceso en que las semillas sean sometidas a mutagénesis, ni que realice los cruces y selecciones que el solicitante propone y menos que deje que dichas semillas mutadas germinen para regenerar plantas in vitro, a partir de las hojas y en presencia de fitohormonas.

Con todo respecto, el solicitante desearía que ese Despacho considere la invención en todo el alcance que establece la reivindicación 1 y sus dependientes, pues como bien lo indica el artículo 51 de la citada Decisión, el alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. Dentro de este contexto es importante que el examinador recuerde que el método reclamado debe ser analizado como un proceso integrado por TODOS los pasos o etapas que lo caracterizan y no fraccionado, como al parecer lo evalúa el examinador.

Sumando a lo expresado anteriormente, resulta pertinente citar lo establecido en la INTERPRETACIÓN PREJUDICIAL 21-IP-2000, con relación a la “EXCLUSIÓN DEL CONCEPTO DE «INVENCION» DE LAS MATERIAS QUE YA EXISTEN EN LA NATURALEZA”. Sobre este particular el Tribunal Andino establece que si de un descubrimiento o materia ya existente se pueden obtener, como consecuencia de la actividad o esfuerzo inventivo del hombre, nuevos productos **o procedimientos** que tengan una utilidad industrial, nos encontraremos ante una **verdadera invención que podrá ser patentada** siempre y cuando no incurra en alguna de las expresas prohibiciones determinadas en el artículo 7 de la Decisión 344.

Complementando la idea anterior, el Tribunal establece que, “*en aplicación del artículo 6 párrafo b) de la Decisión 344, el material biológico, las células o sus componentes que ya existan en la naturaleza, aun cuando sean aislados mediante procedimientos microbiológicos, no son considerados como “invenciones”, sin perjuicio de que sí pueda concederse patentes sobre procedimientos de aislamiento, así como sobre los demás procedimientos microbiológicos, tales como los de cultivo, selección o mutación de microorganismos u otros de carácter físico-químico, pero siempre y cuando cumplan con*



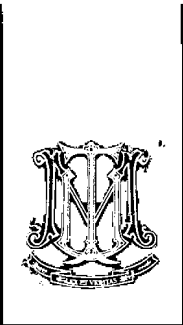
las condiciones objetivas de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial.” (EL SUBRAYADO ES NUESTRO).

Dentro de este contexto, el Tribunal Andino también expresa: “*Incluso, la exclusión del concepto de invención consagrada en el artículo 2 párrafo b) de la Decisión 344 resulta congruente con aquella prevista en el nuevo Régimen Común sobre Propiedad Industrial, aprobado mediante Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y que entrará en vigor el 1º de diciembre del año 2000 (artículo 274). En efecto, conforme a lo dispuesto por el artículo 15 de este último cuerpo normativo, no se consideran invenciones el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, ni los procesos biológicos naturales, ni el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma.*”

Para finalizar la idea y en relación con la “PROHIBICIÓN DE PATENTAR ESPECIES Y RAZAS ANIMALES”, el Tribunal señala “*Por otra parte, como ya se ha expresado, los procedimientos microbiológicos, incluidos los de selección, aislamiento, cultivo o de mutación de microorganismos, al igual que los no biológicos, en tanto cumplan los requisitos objetivos de patentabilidad pueden ser objeto de patente, en razón de que no son el resultado de las fuerzas de la naturaleza, sino que requieren de la intervención del hombre para llevarlos a cabo. Sin embargo, no gozan de protección aquellos procedimientos en los que no exista actividad humana (procedimientos exclusivamente biológicos —o «biológicos naturales» como los denomina el artículo 15 párrafo b) de la Decisión 486—), o si existiendo ésta no es lo suficientemente relevante como para influir en la obtención de los resultados (procedimientos esencialmente biológicos —artículo 7 letra c) de la Decisión 344—). La patentabilidad estará condicionada por tanto, a la intensidad o relevancia de la intervención técnica del hombre en las diversas etapas del procedimiento”.* (EL SUBRAYADO ES NUESTRO).

En vista de lo expuesto en los párrafos anteriores es evidente que la Resolución N°14695 falla al afirmar que la invención reivindicada no puede ser sujeto de patente según lo establecido en el artículo 20c), toda vez que el procedimiento reivindicado en la solicitud bajo análisis precisamente se refiere a un método microbiológico, no a un procedimiento esencialmente biológico como afirma ese Despacho, donde el procedimiento involucra los pasos de selección, cultivo y mutación de semillas de tabaco.

Es más, la objeción planteada por la Superintendencia de Industria y Comercio en relación a que el método de la presente solicitud puede ser considerado un proceso esencialmente biológico ha sido retirada en la mayoría de países (por ejemplo, en Estados Unidos, donde la solicitud está lista para la concesión) que han reconocido en el método reclamado



comprende varios pasos que no son esencialmente biológicos y por lo tanto, ellos hacen que el método no sea un proceso esencialmente biológico.

Como principio general, la presencia de pasos que necesitan la intervención humana en un proceso biológico, donde los pasos causan una alteración del material hereditario, son normalmente suficientes para hacer que un proceso sea "no-biológico", puesto que la alteración del material no ocurriría por sí misma, sin la intervención humana. Como se argumentó a lo largo del numeral 2.1.1, el método reclamado incluye una serie de pasos que son el resultado de la intervención humana, y dichos pasos son lo suficientemente relevantes como para influir en la obtención de las características deseadas.

En este sentido también se ha manifestado la Oficina Europea de Patentes (EPO), que ha expresado en la decisión G1/08 de la Junta de Apelaciones de la EPO, que indica en su encabezado que tal proceso no escapa a la exclusión del artículo 53 (b) Comisión Europea de Patentes (la misma exclusión de Artículo 20c) de la Decisión citada por el examinador) por el mero hecho que éste contiene, como paso adicional o como parte de cualquiera de los pasos de cruzamiento y selección, un paso de carácter técnico que sirve para activar o ayudar a la realización de las etapas de cruzamiento sexual de todo el genoma de las plantas o de la subsecuente selección de plantas, pero éste podría ser el caso, si tal proceso contiene dentro de los pasos de cruzamiento sexual y de selección un paso adicional de carácter técnico, que por sí mismo introduce un rasgo en el genoma o modifica un rasgo en el genoma de la planta producida, de modo que la introducción o modificación de ese rasgo no es el resultado de la mezcla de los genes de las plantas elegidas para cruzamiento sexual, entonces el proceso no se excluye de patentabilidad.

De lo anterior, es evidente que el caso de la presente solicitud se ajusta exactamente a la situación descrita en la jurisprudencia a nivel mundial para los procesos que no están excluidos de la patentabilidad (procesos no esencialmente biológicos, que no está cubiertos por la excepción definida en el artículo 20c) de la Decisión citada por el examinador), toda vez que el proceso reivindicado contiene, dentro de los pasos de cruzamiento sexual y selección pasos adicionales de carácter técnico, que introducen y fijan un rasgo en el genoma, tal rasgo resulta en el fenotipo de alta producción de semillas.

A la luz de todos los argumentos y los datos anteriores, el solicitante respetuosamente requiere que la objeción basada en el artículo 20 c) de la Decisión 486 de la Comunidad Andina sobre las reivindicaciones 1, 2 y 8 al 10 sea retirada y por ende, la Superintendencia de Industria y Comercio proceda a conceder el derecho de patente para la materia reivindicada, pues ella también cumple con los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, como se demuestra a continuación.



2.2. NOVEDAD Y NIVEL INVENTIVO

El señor examinador considera que las reivindicaciones 11 y 15, así como las reivindicaciones que de ellas dependen, carecen de novedad. Lo anterior en virtud de la información revelada en los documentos “How to Process Oilseed on a Small Scale” (En adelante documento D3) y “Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diésel engine” (En adelante documento D4), respectivamente.

2.2.1. Novedad y nivel inventivo de la reivindicación 11

La objeción se basa en el hecho que en el sitio web citado por el examinador se indica que el aceite puede ser extraído a partir de semillas en general (no se incluyen ni especifica que dichas semillas sean de tabaco) por presión.

El examinador cita el documento D4 como documento que destruye la novedad de esta reivindicación y sus dependientes. Sin embargo, en ninguna parte del documento se suministra información sobre la extracción de aceite a partir de las SEMILLAS DE TABACO, por lo tanto, el documento no puede anticipar el procedimiento reivindicado.

Es bien sabido que la existencia de un concepto general no puede anticipar o afectar la patentabilidad de uno particular (por ejemplo el metal no anticipa una reivindicación específica sobre el hierro) y por lo tanto, la objeción de novedad basada en la información de D4 está fuera de lugar. En contexto el examinador ignora lo establecido en el numeral 8.3.1 “*Divulgaciones genéricas y ejemplos particulares*” de la GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD, donde se establece “...una divulgación en términos genéricos no anula la novedad de una invención definida en términos específicos. Por ejemplo si una invención se refiere a la utilización de “cloro” y la invención que se encuentra en el estado de la técnica utiliza un “halógeno”, esta última no anula la novedad de la primera invención.” Siendo así, el documento citado por el examinador puede ser citado para discutir la actividad inventiva, pero su uso para la novedad no es aceptable.

El documento D4 citado por el examinador es un documento general que enseña formas genéricas de extracción de aceite y que no proporciona ninguna indicación sobre un procedimiento de extracción adecuado o preferido para obtener aceite a partir de la semilla de tabaco.

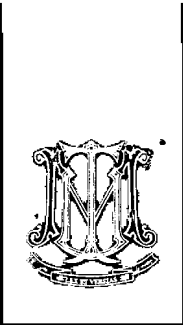
El solicitante cita el documento “*Comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil*” (ANEXO A), que fue publicado con posterioridad a la solicitud bajo estudio y suministra evidencia de que incluso dos años después de la fecha de prioridad de la



solicitud, la extracción de aceite a partir del tabaco mediante presión mecánica fue considerada como un método nuevo y sorprendentemente más eficaz (Ver página 513 columna 2 líneas 19-21 que indican que la presión nunca había sido utilizada para recuperar TSO, y página 515 la columna 2, donde se muestra que el mayor rendimiento fue alcanzado con presión mecánica). Por lo tanto, el anexo A muestra que aún en 2009 para una persona versada en la materia no habría sido obvio que la extracción de TSO mediante presión podría ser más efectiva en términos de rendimiento.

Por el contrario, la objeción por falta de nivel inventivo de las reivindicaciones basada en la información del enlace citado por el examinador parece estar fuera de lugar por las siguientes razones:

- El enlace citado por el examinador, de hecho, se refiere a prensas para presionar cantidades pequeñas.
- Las prensas citadas por el examinador podrían ser útiles para la preparación de productos farmacéuticos y cosméticos. La solicitud en estudio claramente indica que el objetivo es la producción de TSO para uso industrial, en particular para la elaboración de biodiesel.
- Un experto en la materia, que lea la solicitud entiende fácilmente que el objetivo principal es la producción de cantidades de semillas adecuadas para una producción industrial de biocombustibles, que requieren una cantidad de aceite que es completamente diferente de la cantidad de aceite necesaria para la preparación de cosméticos.
- En efecto, las prensas que tienen las capacidades de 3-5 a 50-100 kg por hora, dichas prensas nunca serían adecuadas para la producción industrial de biodiesel, que es el problema que se aborda y se soluciona en la presente solicitud.
- Teniendo en cuenta que una producción promedio anual razonable de aceite para uso como biocombustibles es de 200.000 toneladas/año, es decir, considerando un año en que todos los días de trabajo se hizo una producción diaria de alrededor de 500 toneladas por día, y dado que entre las prensas del documento citado por el examinador, la prensa que tiene mayor capacidad podría producir, en la mejor hipótesis, cerca de 2,4 toneladas/día, siendo así, para contar con la cantidad normalmente requerida para los combustibles se necesitaría una planta industrial con más de 250 prensas y operarios relacionados a ellas, para obtener la cantidad diaria deseada.



Es evidente que una persona versada en la materia, en procura de resolver el problema planteado, es decir, a fin de producir TSO para uso industrial como biocombustible nunca habría considerado las prensas reportadas por Monfort como las prensas adecuadas para superar el problema ya mencionado.

De hecho, el experto en la materia, que pretendiera obtener un alto rendimiento en la producción TSO, no habría contemplado la extracción mediante presión como un método adecuado. Los documentos citados por el examinador no muestran ningún fundamento que motivara al experto a optar por la presión en lugar de la extracción química clásica, a fin de encontrar un método alternativo con un mayor rendimiento en la producción de TSO. De hecho, el uso de prensas, tales como las Monfort era conocido en un campo técnico completamente diferente.

Como se indica en la página 15 líneas 27-33 (y fue confirmado por el anexo A dos años más tarde. Ver resultados en la página 515 la columna 2 y conclusiones) el método reivindicado tuvo, sorprendentemente, un rendimiento superior al 70%, lo que fue un rendimiento totalmente inesperado, después de usar dichos métodos de presión sobre semillas tan pequeñas como las del tabaco. En la presente invención el hallazgo que el método de prensado aplicado sobre semillas de tabaco tiene un rendimiento comparable con el rendimiento obtenido en semillas de gran tamaño, tiene aplicaciones extremadamente ventajosas.

Es muy poco probable que un experto del sector técnico de la solicitud hubiera visto las prensas del documento citado como prensas adecuadas para la producción de TSO para usos industriales como biocombustible. Además, se observa que el enlace citado por el examinador guarda absoluto silencio acerca de la extracción de aceite a partir de semillas de tabaco. A partir de los argumentos anteriores, es evidente que la objeción obviada hecha por el examinador no tiene un soporte real en la técnica citada.

Por el contrario, la totalidad del documento citado por el examinador indica los métodos de extracción química, con relación a la extracción de aceite a partir de tabaco, y en ninguna parte insinúa o sugiere, incluso cuando discute el uso de aceite de tabaco como fuente de bioenergía, que el método de extracción debe ser cambiado para aumentar la productividad.

Adicionalmente, el TSO producido con el método de prensado de la invención ha revelado diferencias químicas con respecto al TSO obtenido por extracción química convencional, las cuales hacen que el aceite extraído mecánicamente más adecuado para su uso como biodiesel que el aceite obtenido por extracción química.

En el estado del arte citado por el examinador no hay sugerencias o indicaciones que



hubieran motivado a una persona versada en la materia a proceder ciertamente con la extracción con prensas.

Los argumentos anteriores demuestran que, a pesar de la evaluación del examinador, parece que el campo técnico de la invención y el objetivo de la persona versada en la materia, que era incrementar el rendimiento de la producción de las cantidades de aceite adecuado para la producción de combustibles industriales, y no para farmacéuticos y los cosméticos, no fueron debidamente tenidos en cuenta. Los argumentos presentados anteriormente apoyan el hecho que un experto en la materia no habría tenido ninguna motivación para tener en cuenta las técnicas de prensado, como las descritas en el enlace, para solucionar el problema de incrementar el rendimiento de la producción de aceites para biocombustibles.

Ahora bien, siguiendo lo establecido en el numeral 9.4.3 relativa al “*Nivel inventivo de reivindicaciones dependientes*” de la GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD, donde se establece “*El examinador debe tener presente que una reivindicación dependiente contiene todas las características de la reivindicación de la cual depende. Por ello, si la reivindicación independiente es nueva, las reivindicaciones dependientes también lo son. Este principio se aplica igualmente al nivel inventivo y a la aplicación industrial.*” En vista de lo indicado en el numeral en comento, las reivindicaciones dependientes también son novedosas.

2.2.2. Novedad y nivel inventivo de la reivindicación 15

La novedad de la reivindicación relativa al biodiesel ha sido objetada por el examinador basándose en el documento D3.

D3 se refiere al biodiesel que contiene el aceite de tabaco extraído con métodos convencionales. En ninguna parte D3 se refiere al aceite de tabaco extraído con prensado en frío.

Como la reivindicación 15 se refiere estrictamente al biodiesel que comprende aceite de tabaco obtenido mediante el método de prensado de la reivindicación 11, es imposible que D3 pueda anticipar la novedad de la reivindicación 15.

Adicionalmente, junto con la comunicación anterior, se proporcionaron datos de análisis químicos que demuestran que el aceite obtenido por presión y el aceite obtenido por extracción química son diferentes. Por lo tanto, los biodieseles que comprenden diferentes aceites son necesariamente diferentes entre sí. En este orden de ideas, no es claro cómo podría D3 anticipar la novedad del aceite obtenido de acuerdo con la invención.



El solicitante ha aportado datos que demuestren la diferencia química entre el aceite extraído por prensado y aceite extraído químicamente, el examinador no puede ignorar los datos experimentales proporcionados y debería, si quiere proceder a objetar la novedad de la reivindicación 15, anexar evidencia de que el aceite, tal como se reclama en la presente solicitud, estaba disponible en el estado de la técnica en el momento de presentación de la solicitud.

El examinador no puede separar los conceptos de los documentos citados, ni puede ignorar que el biodiesel divulgado en la D3 de ninguna manera es el biodiesel donde el aceite de semilla de tabaco ha sido obtenido tal como se reivindica en la reivindicación 11 (es decir, el biodiesel de la reivindicación 15) y que los dos métodos de extracción conducen a la generación de aceites que tienen diferentes propiedades químicas y físicas, como ya fue discutido.

La actividad inventiva de las reivindicaciones de productos es directamente derivable de la no obviedad del método de extracción y de las propiedades químicas inesperadas del aceite de extraído por prensado.

En vista de los argumentos expuestos, se solicita a ese Despacho retirar las objeciones o proporciona argumentos claros sobre cómo un biodiesel obtenido por extracción química y que presenta una composición distinta a los biodiesel obtenidos por extracción con prensa puede afectar la novedad del biodiesel reivindicado en la presente solicitud.

Al igual que para las reivindicaciones dependientes de la reivindicación 15, aplica lo establecido en el numeral 9.4.3 relativa al “*Nivel inventivo de reivindicaciones dependientes*” de la GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD, y en consecuencia, las reivindicaciones dependientes de la reivindicación 15 también son novedosas.

2.2.3. Nivel inventivo de las reivindicaciones 3, 5, 6 y 7

Adicionalmente, la Resolución recurrida objeta el nivel inventivo de las reivindicaciones 3, 5, 6 y 7, basándose en el contenido de los documentos EP 0257993 (En adelante documento D1) y PLANT CELL PHYSIOL. 2002. Pág: 1518 – 1525 (En adelante documento D2). Con referencia a la objeción sobre la actividad inventiva, el solicitante desiste de las citadas reivindicaciones. En consecuencia, los documentos D1 y D2 ahora son irrelevantes.

2.2.4. Novedad y nivel inventivo de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10



En vista que la única causal que expone la Resolución N°14695 para negar las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10 es que su objeto está exceptuado de patentabilidad por el artículo 20c y la Resolución N°14695 no hace ningún pronunciamiento en relación con la novedad y el nivel inventivo de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10, es válido suponer que dichas reivindicaciones cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 14 de la Decisión 486.

A pesar de ello, por si existiese alguna duda sobre la novedad y el nivel inventivo de las reivindicaciones en cuestión, el solicitante desea aclarar de manera voluntaria que la mención que aquí se hace del documento de Patel, citado como documento D6 durante el procedimiento PCT (Anexo G de este memorial), se debe a que dicho documento era el que había reportado la planta productora de mayor cantidad de semilla hasta el momento en que el solicitante radicó la solicitud prioritaria.

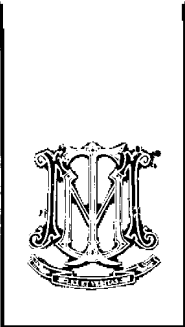
El método mutación reivindicado es lo que hace excepcional a la planta reclamada. De hecho, las plantas con una producción de semilla como la que se define en las reivindicaciones de la presente solicitud nunca se habían descrito en la técnica anterior. Incluso las mejores plantas productoras de semilla divulgadas en el estado de la técnica, que corresponden al documento D6 (Patel et al) citado en el Reporte Preliminar Internacional sobre Patentabilidad (IPRP), son plantas que producen 1.171 Kg por hectárea, siendo la producción obtenida, como se describe en dicho documento, en tres cosechas de la planta.

En efecto, el documento D6 pone de manifiesto, que la producción de 1.171 kg de semillas/ha, reportada para la variedad de tabaco de mascar A145, se obtuvo con 2 a3 cosecha (ver página 45, columna 1 línea 1) lo que significa que la planta produce una cantidad de 585 a 390 kilos de semilla por cultivo.

La solicitud en comento no contempla en ninguna parte una cosecha múltiple, por el contrario, cuando se hace referencia a "*la cosecha de semilla*" la aplicación siempre menciona "la cosecha de semilla", por consiguiente debe ser claro que los datos reportados se refiere a un sólo cultivo y una única cosecha.

Las declaraciones de los anexos B, C, D y E, que se adjunta a este memorial, así como los datos proporcionados anteriormente indican que las plantas de la invención presentan una producción de semillas por hectárea por cosecha que es al menos dos veces el límite inferior indicado en la reivindicación 1.

De hecho, como D6 divulga plantas que producen 1.171 Kg de semillas por hectárea, D6 no anticipa las reivindicaciones independientes 1 y 8 de la solicitud y todas las



reivindicaciones dependientes de las mismas, puesto que dichas las reivindicaciones se refieren a plantas cuya producción es de **al menos 2000 kilogramos** por hectárea por cosecha como claramente se precisa en la descripción.

Como no hay ningún documento citado por el examinador en la Resolución N°14695 sobre las plantas mutadas, el solicitante hace referencia a los documentos citados en el informe de búsqueda realizado durante la fase internacional y resalta el por qué dichos documentos no afecta la novedad ni el nivel inventivo de la solicitud colombiana. Los cuales mencionados en dicho informe fueron:

D1 EE.UU. 6.730.832 (Domínguez et al.)

D2 Kodym y Afza, 2003. Meth. Mol. Biol.. 236:189-204

D3 Madoka et al., 2002. Plant Cell Physiol. 43:1518-1525

D4 Usta, 2005. Bioenergía Biomasa 28:77-86

D5 Veljkovic et al., 2006. Combustible 85:2671-2575

D6 Patel et al., 1998. Tob. Res. 24:44-49

D1, que es una patente de EE.UU. que da a conocer un método para producir plantas con un fenotipo determinado (en ese caso, plantas que comprenden una cantidad superior al promedio, de al menos un aminoácido) donde las plantas son sometidas a mutagénesis y rastreadas para detectar la característica fenotípica deseada.

D2, describe técnicas generales de mutagénesis física y química en las plantas.

D3 es un documento que divulga la transformación de cloroplastos con un operón modificado, el cual incrementa la producción de acetil-CoA carboxilasa, que causa el aumento de la longevidad de la semilla y el incremento en el rendimiento de las semillas de tabaco. La planta, mutada en su contenido de ácidos grasos tuvo como efecto secundario el aumento del número de semillas por cápsula (el número de cápsulas y el número de flores permaneció invariable) como se puede verificar en la página 1523 columna 1; párrafo primero. Al parecer, dicho efecto unido a la longevidad de la de la hoja (columna 1 de la página 1524), es sugerido para otras plantas.

D4 da a conocer el uso potencial del aceite de semilla de tabaco como biocombustible. De acuerdo con este documento, las semillas, que son un subproducto de la industria del tabaco



se pueden utilizar para la extracción de aceite. El aceite se obtiene por extracción Soxhelt y para los mejores productores, la variedad reportada por Patel et al (D6).

D5 se refiere al posible uso del aceite de las semillas de tabaco como biodiesel, donde las semillas son un subproducto de la industria del tabaco. El aceite extraído de las semillas mediante extracción asistida por ultrasonido, utilizando n-hexano (Ver página 3672, columna 1 líneas 3-4) fue probado como biodiesel y varios parámetros químicos y físicos del aceite fueron investigados.

D6 da a conocer un estudio sobre la posibilidad de usar el tabaco para la producción de semillas (aceite) y de usar la torta oleaginosa extractada con hexano (ver pág. 45, columna 2 línea 19).

D6 proporciona varias comparaciones entre diferentes variedades de tabaco, siendo la variedad de mascar A145 la más alta productora de la semilla, con un rendimiento de semilla de 1,171 kg/ha y una producción de aceite de 342,9 kg/ha (Ver página 44 Columna 1 líneas 4-14). El rendimiento de semilla de D6 es obtenido, como se describe en la página 46 columna 1 línea 1 de D6, con 2 a 3 cosechas, que corresponden a un rendimiento de semilla de alrededor de 585 kg/ha, esto es 390 kg/ha por cosecha.

D6 enseña que la planificación de la producción de tabaco podría pasar de la hoja a la semilla a través de "cultivos no podados plantados cerca" (ver. Páginas 44, columna 2, línea 13-18).

Teniendo en cuenta el hecho que D6 comparte muchas características técnicas con la solicitud en cuestión, el solicitante lo considera el antecedente más cercano.

De acuerdo con la opinión del solicitante, el documento que mayor cantidad de características comparte con la invención es el D6, que se puede considerar como el antecedente más cercano. La persona experta en la técnica, iniciando a partir de D6 se enfrentaría al problema de cómo incrementar el rendimiento de las semillas en plantas de tabaco. La solución insinuada en D6 es el suministro de cultivos no podados plantados cerca. Por lo tanto, la solución dada en D6 está basada en técnicas de crecimiento aplicadas a plantas de tabaco.

El experto en la materia sabe que para producir hojas de buena calidad para fumar/masticar, planta de tabaco debe ser podada, lo que resulta en no hay oferta comercial de semillas. Si el tabaco es cultivado para producir aceite a partir de semillas de aceite, este debe ser cultivado como no podado y plantado cerca, entonces, después de la recolección del tallo y la hoja, las semillas podrían ser utilizadas para la extracción de aceite.



Ninguno de los documentos citados en el informe de búsqueda o en el IPRP enseña o sugiere que, con el fin de resolver el problema planteado, las plantas deben ser modificadas por mutagénesis con el fin de producir más semillas.

En procura de mejorar la producción de semillas, el experto en la materia habría encontrado disponible en el estado de la técnica las enseñanzas de D3, donde un aumento de la producción del número de semillas se obtuvo como efecto secundario en Tabaco sometido a la transformación de cloroplastos con un operón modificado que incrementa la acetil-CoA carboxilasa. De hecho, la transformación divulgada en D3 resultó en una planta mutada en el contenido de ácidos grasos, que muestra un aumento de número de semillas por cápsula (el número cápsulas y el número de flores permanece invariable) ver. página 1523 columna 1, párrafo primero.

Ha de notarse que D3 indica sin ambigüedad que la planta que muestra aumento de las semillas, tenía un fenotipo indistinguible de la planta de tipo silvestre (ver página 1522 última línea de la columna 1 y la primera línea de la columna 2, donde se establece que *"las plantas transgénicas fueron indistinguibles de las plantas de tipo silvestre"*).

El experto en la materia, que parta de la información contenida en D6, ciertamente habría considerado D3 y habría, probablemente, sometidos al mejor productor de semillas descrito en D6 a la transformación reportada en D3.

Si por alguna razón una persona versada en la materia hubiera hecho caso omiso de D3 y hubiera decidió mirar en otros documentos, ninguna enseñanza sobre cómo resolver el problema planteado habría estado disponible en los documentos del estado de la técnica citados por la Autoridad Internacional. De hecho, aunque D4 se refiere al mismo campo técnico de D6 y de la invención, en ninguna parte de D4 se insinúa o sugiere que la planta debería o podría ser modificada para la producción de semillas. En consecuencia, D4 no proporciona indicaciones sobre cómo podría lograrse un incremento en la producción de semillas.

D1, enseña que, como se conoce en la técnica, la mutagénesis puede ser utilizada como medio para obtener un fenotipo deseado y señala que después del evento mutacional, se han seleccionado plantas con el fenotipo deseado. En particular, D1 se centra en la selección de plantas con la producción de al menos un aminoácido en una cantidad superior a la media.

Una persona versada en la materia, enfrentada al problema planteado, que combinara D6 con D1 no habría tenido una indicación en el estado del arte sobre el fenotipo a seleccionar, dado que D3 establece claramente que el fenotipo de la planta que produce una mayor



cantidad de semillas no se distingue del fenotipo de la planta silvestre a partir de la que se obtuvo la planta de alta producción de semillas.

Parecería que, a partir de la técnica anterior, el experto en la materia no habría sido motivado a proceder con mutagénesis + la selección de un fenotipo no divulgado para resolver el problema de cambiar la planificación de la producción de tabaco de la hoja a las semillas.

Por el contrario, el solicitante de la presente invención, al proporcionar plantas de tabaco mutadas con una productividad de grano superior a todas las plantas del tabaco conocidas en el estado de la técnica, esto soportado mediante los datos técnicos proporcionados anteriormente y las declaraciones de los anexos B-F, adjuntos a esta comunicación.

El problema fue resuelto por el solicitante mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis en varios cruces obtenidos, y mediante la identificación de un número de parámetros de selección que no habían sido divulgados en el estado de la técnica para la selección del mutante deseado. El método proporcionado por el solicitante se describe con todo detalle en la solicitud y en las reivindicaciones.

Sumado a lo anterior es de recordar que el método de la invención enseña el uso de mutagénesis con el fin de obtener un fenotipo genéricamente deseado, y también enseña parámetros específicos para la selección física del fenotipo de la planta después de la mutagénesis y antes y después de una regeneración in vitro de la planta, lo cual no se enseña en los documentos del estado de la técnica citados por la autoridad de búsqueda internacional.

Considerando el contenido de la Resolución N°14695, los argumentos antes expuestos que demuestran la novedad y el nivel inventivo de la solicitud bajo análisis y el hecho que el objeto de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10 no es un método esencialmente biológico, como erradamente interpretó esa Superintendencia, se solicita a ese Despacho proceder con la concesión de las reivindicaciones en cuestión.

No obstante, se desea recordar a ese Despacho que **de existir** algún impedimento para conceder las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10, por considerar que las mismas no son novedosas o inventivas o en razón de la existencia de un impedimento distinto a los ya mencionados en la Resolución N° 14695, **el solicitante tiene derecho a conocer dichas objeciones con anticipación a la emisión de una resolución de negación.**

Lo anterior en virtud del artículo 45 de la Decisión 486, el artículo 29 de la Constitución Política que indica que *“el debido proceso se aplicará a toda clase de actuaciones*



*judiciales y administrativas”, el inciso primero de los artículos 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo establece que **“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”** (EL SUBRAYADO ES NUESTRO) y “(...) Deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”, respectivamente.*

2.3. CONCLUSIÓN

La Superintendencia de Industria y Comercio erró al interpretar el objeto de la reivindicación pues no consideró todas las etapas que caracterizan el método de la invención, y contrario a lo establecido por el Tribunal de Justicia Andino, ignoró el hecho que tres de las cuatro etapas que definen dicho método son el resultado de la intervención humana y como resultado de estas equivocaciones afirmó que un método microbiológico, que involucra los pasos de selección, cultivo y mutación de semillas de tabaco, es un método esencialmente biológico, excluido de patentabilidad según el artículo 20 literal c) de la Decisión 486. Por tanto, las reivindicaciones 1, 2 y 8 a 10 no se refieren a métodos esencialmente biológicos.

La Superintendencia de Industria y Comercio se equivocó al afirmar que el documento D4 destruye la novedad de la reivindicación 11 y sus dependientes, toda vez que en ninguna parte del documento se suministra información sobre la extracción de aceite a partir de las SEMILLAS DE TABACO, por lo tanto, el documento no puede anticipar el procedimiento reivindicado. Adicionalmente, las enseñanzas de dicho documento se orientan a la producción de aceites para el sector cosmético y farmacéutico, de ninguna manera dichas enseñanzas puede ser aplicadas a la producción industrial de aceites para ser usados como biocombustibles.

También es errada la afirmación que D3 afecta la novedad la reivindicación 15 y sus dependientes, pues ese documento se refiere al biodiesel que contiene el aceite de tabaco extraído con métodos convencionales. En ninguna parte D3 se refiere al aceite de tabaco extraído con prensado en frío. Esto marca una diferencia incluso en la composición del aceite y por ende, del biodiesel. Siendo que el biodiesel de la presente invención es diferente del aceite generado mediante extracción química, el objeto de la reivindicación 15 y sus dependientes es novedoso.

El solicitante desiste de las reivindicaciones 3, 5, 6 y 7, en consecuencia, los documentos D1 y D2 ahora son irrelevantes.



La única causal que expone la Resolución N°14695 para negar las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10 es que su objeto está exceptuado de patentabilidad por el artículo 20c y la Resolución N°14695 no hace ningún pronunciamiento en relación con la novedad y el nivel inventivo de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10. Siendo así, es válido suponer que dichas reivindicaciones cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 14 de la Decisión 486.

A pesar de los hechos expuestos en el párrafo anterior, el solicitante aclara de manera voluntaria que los documentos citados durante el procedimiento PCT para desvirtuar la novedad y el nivel inventivo tampoco afecta la patentabilidad de la presente solicitud, pues ellos de ninguna manera resuelven el problema de incrementar el rendimiento de la producción de aceites para biocombustibles.

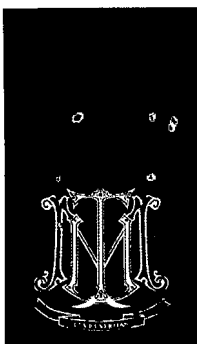
Los documentos citados durante el examen internacional no solucionan el problema de incrementar el rendimiento de la producción de aceites para biocombustibles mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis en varios cruces obtenidos, la identificación de un número de parámetros de selección que no habían sido divulgados en el estado de la técnica para la selección del mutante deseado y la regeneración in vitro de la planta.

Dado que la Superintendencia de Industria y Comercio no ha realizado ningún cuestionamiento sobre la novedad o el nivel inventivo de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 8 a 10, ni en el oficio expedido bajo el artículo 45 de la Decisión 486 ni en Resolución N°14695, se recuerda a ese Despacho que de existir alguna objeción al cumplimiento de los requisitos antes señalados, será necesario conceder al solicitante la oportunidad de argumentar sobre este particular.

3. ANEXO

Me permito incluir los anexos A a G, anunciados a lo largo del numeral 2 del presente escrito. Ellos corresponden a:

- ANEXO A: Documento titulado “Comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil.”
- ANEXO B a F: Declaraciones de usuarios de la tecnología cubierta por la solicitud de patente bajo análisis.
- ANEXO G: Artículo de Patel et al., 1998. Tob. Res. 24:44-49 citado como documento D6 en el informe de búsqueda internacional.



ANEXO G: Artículo de Patel et al., 1998. Tob. Res. 24:44-49 citado como documento D6 en el informe de búsqueda internacional.

4. PETICIÓN

De acuerdo a lo manifestado en el numeral 2 del presente escrito, solicito a usted:

- a. Que de conformidad con lo previsto por los artículos 3 (inciso 3); 35 (inciso 2) y 59 (inciso 2) del Código Contencioso Administrativo se tengan en cuenta y se resuelvan cada uno de los argumentos y cuestiones planteadas.
- b. Que se revoque la resolución No. 14695 del 01 de abril de 2013 expedida por el Superintendente de Industria y Comercio, y se proceda a conceder el privilegio de patente de invención a la solicitud de mi mandante

Del Señor Jefe,

JUAN CARLOS URIBE RESTREPO
C.C. No. 79.159.313 de Bogotá
T.P.A. 54.493 de Min. Justicia

1 2 3 4
5 6 7 8
9 10 11 12
13 14 15 16

ANEXO A

TRABAJO INVESTIGATIVO

COMPARACION DE TECNICAS PARA LA EXTRACCION DE ACEITE DE SEMILLA DE TABACO.

**Ivana T. Stanisavljevic¹, Dragan T. Velic², Zoran B. Todorovic¹,
Miodrag L. Lazic¹ and Vlada B Veljkovic¹**

1: La Facultad de Tecnologia , Leskovac, Serbia

2: Zdravlje-Actavis, Leskovac, Serbia

El rendimiento y la composición del ácido graso (FA) del aceite obtenido de las semillas de un tipo de planta de tabaco semi oriental (*Nicotiana tabacum* L.) de tipo Otlja por varias técnicas recuperadas que son: Extracción de Soxhlet (SE), Maceración (ME) y la extracción ultrasónica directa e indirecta (IUE and DUE, respectivamente) y la presión fría (CP) fueron comparadas.

Las extracciones de disolvente de semillas de tabaco de tierra (TS) se llevaron a cabo por n-hexano, mientras que CP se utilizó para recuperar el aceite de la TS. El rendimiento de aceite más alto (32,9 g/100 g, ie93% del contenido de aceite en las semillas) se logró por CP. Asistido ultrasónicamente las extracciones disolventes parecen ser ineficaces en la recuperación del aceite de la semilla de tabaco de tierra y los rendimientos del aceite eran solo de 45 a 55% del contenido del aceite dependiendo de las condiciones de la extracción. Independientemente de la técnica utilizada, el ácido linoleico fue el factor principal en el aceite de semilla de tabaco y la composición del aceite de semilla de tabaco extraída por SE, ME, IUE y CP fueron muy similares entre sí y la composición del aceite de

semilla de tabaco por DUE dependió de la entrada de energía ultrasónica. El contenido de ácido linoleico se redujo, mientras que el contenido AG saturados se incremento mediante el aumento de la potencia ultrasónica de 5 a 50 W.

PALABRAS CLAVES : Prensado en frio/ Extracción/Ácidos grasos/Aceite de semilla/Tabaco.

Recibido el 14 de Octubre de 2008, aceptado: Diciembre 22 de 2008.

DOI 10.1002/ejlt.200800232

INTRODUCCION

En el proceso de producción de la hoja de Tabaco (*Nicotiana tabacum*L.), la semillas se conocen como residuos en la agricultura . Mediante el procesamiento de las semillas de tabaco (TS), dos productos posiblemente valiosos se pueden producir: el aceite y la torta. Cultivadores de Tabaco dan un buen rendimiento de aceite que van hasta un 40% de la masa total de la semilla y la parte restante se compone de fibra cruda, proteína, almidón y material inorgánico (1). Los principales ácidos grasos (AG) de aceite de semilla de tabaco (TSO) son: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico [2]. Trilinoleína y palmitodilinolein son los triglicéridos principales que se encuentran en un 90% de la composición del aceite (3) La semilla de aceite de tabaco es libre de nicotina y se puede comparar con los otros aceites comestibles (4) debido a la baja proporción de ácidos grasos saturados que es lo deseado desde una perspectiva de salud publica, TSO puede ser considerada como nutricionalmente apropiada, particularmente en comparación con los aceites vegetales de alto contenido de

grasa saturada. Un inconveniente del TSO puede ser su alto contenido de colesterol (5). Además, TSO se demuestra que es un sustituto para el combustible diesel [6] o una materia prima para la producción de biodiesel [7, 8]. Por otra parte, la torta de TS, un subproducto en la extracción de petróleo, es rica en nitrógeno, predominantemente en la forma de aminoácidos (15,6%) [9], y podría incorporarse en mezclas de concentrados para la alimentación de ganado lechero, en hasta aproximadamente 25% de la ración [10]. De esta manera, TSO representa una posible esperanza para el uso "saludable" del tabaco y para el futuro de la agricultura del tabaco [11].

Los procedimientos para la extracción de aceite de semillas son generalmente extraídos con disolventes (SE) y presionando. Hasta el momento, el aparato de extracción de Soxhlet (SE) el empleo de n-hexano [7, 12, 13] o éter dietílico [6] se ha utilizado principalmente para la extracción de TSO en condiciones de laboratorio. Maceración (ME) usando éter de petróleo y n-hexano también se ha empleado [2, 14]. Extracción ultrasónica indirecta (IUE) se ha utilizado recientemente para extraer el aceite del TS [11], pero la extracción ultrasónica directa (DUE) y de presión en frío (CP) aún no se han utilizado para la recuperación de TSO. A pesar de varias técnicas de recuperación que se han utilizado para obtener TSO, no existe un estudio comparativo sobre la influencia de la técnica de recuperación y las condiciones de funcionamiento en el rendimiento y la composición de AG de TSO.

El presente estudio se ocupa de la composición y el rendimiento de Acidos Grasos

de los aceites recuperados de las semillas de tabaco semi-oriental (*Nicotiana tabacum* L.) de la planta, tipo Otlja, mediante diversas técnicas de recuperación, que son: SE, ME, IUE, DUE y CP. Las extracciones de disolvente del aceite de la semilla de tabaco de tierra se llevaron a cabo por n-hexano, mientras que CP se utilizó para recuperar el aceite de la semilla de tabaco. Los principales objetivos fueron comparar rendimientos y composiciones del aceite de semilla de tabaco obtenida por diversas técnicas de recuperación y para seleccionar la más favorable. Se prestó especial atención a los efectos de la sonicación directa sobre la eficacia y la composición en la extracción de aceite de semilla de tabaco.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Se utilizaron las semillas de una (*N. tabacum* L.) variedad del tabaco semi-oriental, el tipo Otlja. El contenido de humedad, determinado por secado a 105 °C hasta masa constante, fue del 5,5%. Antes de la extracción de disolvente, las semillas se molieron en un molino eléctrico con un cuchillo de rotación rápida (15.000 rpm; 1 min) a un polvo fino que pasa a través de la pantalla de 0,63 mm. Para uno de los experimentos, la molienda se repitió cinco veces, cada vez bajo las mismas condiciones (15.000 rpm, 1 min). n-hexano (Merck, Darmstadt, Alemania) se utilizó como el disolvente de extracción. El estándar de ésteres metílicos (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) contenía ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico (20% de cada éster).

Metóxido de sodio (Merck) se usó para preparar el éster de metilo de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de tabaco.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE

EXTRACCIÓN SOXHLET

La semilla de tabaco de tierra y n-hexano (100 ml) se pusieron en el aparato Soxhlet. El disolvente se hirvió y se sometió a reflujo en el extractor durante un período de 90 min (seis ciclos de extracción). Anteriormente, encontramos que el rendimiento del aceite no se aumentó después de que el séptimo ciclo. El extracto líquido se transfirió a un evaporador rotatorio al vacío, y el disolvente se evaporó a 50 °C hasta masa constante.

Maceración

ME, se realizó en una proporción de semillas a disolvente de 1: 3 g / mL a 25 °C (0,1 °C) durante 20 min. La relación de semillas-a-disolvente de 1: 3 g / ml se utilizó en todos los experimentos porque hemos demostrado anteriormente [2] que el rendimiento de aceite obtenido por ME se aumentó sólo en un 6,8% cuando se cambió la relación de semillas-a-disolvente de 1: 3 a 1: 10 g / ml. El TS suelo (5 g) fueron llevados a un envase Erlenmeyer (100 ml) colocado en un baño de agua termostatzado y n-hexano (15 ml) se añadió. Agitación adicional o batida no fue empleada. Excepcionalmente, en experimentos en los que se estimó el efecto de la agitación sobre la eficacia de la extracción, se tomaron 16,7 g de semilla de tabaco de tierra y 50 ml de n-hexano y se llevaron a un envase (100 ml) colocado en el baño de agua termostatzado. Un agitador de hélice a una velocidad mínima

mantiene las partículas de siembra suspendidas en el líquido. Al final de cada ciclo de extracción el extracto líquido se separa del residuo por filtración al vacío.

La torta de semillas se lavó dos veces con disolvente fresco (20 ml). Los filtrados se recogieron y el disolvente se evaporó en un evaporador de vacío rotatorio a 50 °C.

Extracción de ultrasonido indirecta

IUE se llevó a cabo usando un baño de limpieza por ultrasonidos (Sonic, Nis, Serbia; potencia total nominal: 3650 W; dimensiones internas: 30615620 cm) que funciona a 40 kHz de frecuencia. El baño se llenó con agua destilada hasta un tercio de su volumen (aproximadamente 2,5 L). La temperatura se controló y se mantuvo a 25 °C (60,1 °C) haciendo circular agua desde un baño termostatzado por medio de una bomba. IUE se llevó a cabo en una relación de semillas-a-disolvente de 1: 3 g / ml y en 25 °C durante 20 min. El tiempo de extracción había sido optimizado anteriormente para esta técnica [11].

Las semillas de tabaco de tierra (5 g) ANDN-hexano (15 ml) se llevaron a un envase Erlenmeyer (100 ml) y se colocaron en el baño de ultrasonidos y la suspensión se sometió a ultrasonidos durante 20 min. Ni agitación adicional ni agitación se empleó, excepto en el experimento en el que el ultrasonido se combinó con la acción de un agitador de hélice de mantenimiento de las partículas de siembra (16,7 g) en suspensión en el disolvente (50 ml). El modo de proceder para obtener el aceite era el mismo que el descrito en la Sección 2.3.

La potencia ultrasónica disipada a través de la sonicación indirecta se midió por el método calorimétrico, es decir, mediante la determinación de la tasa del aumento de la temperatura debido a la conversión de la energía de ultrasonidos en calor. La temperatura en el envase de extracción después de encender el generador de ultrasonidos se midió con un termómetro digital termopar tipo K (Simetría, Leskovac, Serbia). El ultrasónica disipada de energía se midió por separado a partir del experimento de extracción en las mismas condiciones (baño de ultrasonidos, 40 kHz, la relación de semillas-a-disolvente de 1: 3 g / ml, n-hexano) y se determinó que era 2 W.

Extracción ultrasónica directa

La semilla de tabaco de tierra (50 g) y n-hexano (150 ml) se pusieron en un reactor ultrasónico (URS 1000, ELAC, Nautic, Alemania de diámetro interior 106 mm, altura: 200 mm, el volumen total del reactor: alrededor de 1,7 dm³) equipado con un transductor ultrasónico (rango de frecuencia: 40 a 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 suministrada al sistema de extracción por el generador de ultrasonidos se leyó de una pantalla digital. La extracción de aceite se lleva a cabo a 25 °C aplicación de una frecuencia constante de 1.865 kHz y tres potencias diferentes: 5, 10 y 50 W, la frecuencia elegida garantiza una operación estable en toda la gama de ultrasonidos de energía. Anteriormente, hemos demostrado que las frecuencias de sonicación de hasta 2.250 kHz no tuvieron ningún efecto significativo en el rendimiento de aceite a una potencia constante de ultrasonidos (50 W), que era 19,4 ± 0,3 g/100 g. Después de 20 min

de sonicación sin agitación adicional, el extracto líquido se separa del residuo sólido por filtración al vacío. La torta de semillas se lavó dos veces con disolvente fresco (50 ml). Los filtrados se recogieron y el disolvente se evaporó en un evaporador de vacío rotatorio a 50 °C.

Prensado al frío

La semilla de tabaco (1,000 g) es presionada por una prensa hidráulica (Komet, Alemania) a través de tres boquillas (diámetro de 15, 10 y 6 mm). La prensa no implica la mezcla y el desgarramiento de las semillas.

La torta de semillas, se trituró con un molino eléctrico y el aceite residual se extrajo mediante el uso de n-hexano en una proporción de semillas-a-disolvente de 1: 3 g / ml y 25 °C durante 60 min. El nuevo procedimiento para obtener el aceite es el mismo descrito en la Sección 2.3.

2.3 DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS EN LAS SEMILLAS DE ACEITE DE TABACO

La composición de Ácidos Grasos del aceite de semilla de tabaco se determinó por análisis por GC después de que los ácidos grasos se habían transformado en ésteres metílicos [2].

La metilación de las muestras de aceite se llevó a cabo inmediatamente después de la evaporación del disolvente de los extractos. Los ésteres metílicos se almacenaron en recipientes de vidrio oscuro y sellados llevados a un congelador hasta que fueron analizados por GC. Los ésteres metílicos del aceite de semilla de

tabaco se analizaron usando un cromatógrafo de gases Agilent 6850 equipado con una columna capilar DB WAX (30 m6 mm60.25 0,25 mm) y un detector de ionización de llama. Se utilizó el siguiente programa de temperatura: columna, 50 7C, 1 min, 25 7C/min a 200 7C/min 7C y 3 200-230 7C;Inyector, 250 7C, detector: 280 7C. Nitrógeno, hidrógeno y aire a caudales de 20, 30 y 400 ml / min, respectivamente, fueron utilizados para el análisis. El volumen de la inyección de aceite fue de 0,2 ml. Los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y ácidos linolénicos se identificaron por comparación de los tiempos de retención de los componentes de aceite con los de los ésteres metílicos estándar. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 1:Rendimientos de aceite obtenidos por diferentes técnicas de recuperación.						
Tecnica de recuperacion		Semillas	Semillas-a relación de disolvente \$ [g / ml]	Duración de extracción [min]	El rendimiento de aceite \$ [g oil/100 g de semillas] 25 7C BT	
					25 Grados	BT
Presion al frio (CP)		No en el suelo	–	–	32,9	–
Extracion Soxhelt (SE)		en el suelo	01:10	90	–	31.1{
Maceracion (ME)		en el suelo	01:03	20	17.7	19.9{
Extraccion Indirecta Ultrasonica(IUE),2 W (0.134 W/g)		en el suelo	01:03	20	18.2	21.0¥
Extraccion Ultrasonico Directa (DUE)	5 W (0.048 W/g)	en el suelo	01:03	20	16.2 17.7 19.4	–
	10 W (0.096 W/g)					
	50 W (0.481 W/g)					

§ Solvente extractor n-hexano.

\$ todos los experiment fueron ejecutados en duplicado.

BT, temperatura de ebullicion.

{ Temperatura mejorada (cerca de la temperatura de ebullición).

{[2].

¥[11].

3 Resultados y discusión

3.1 Rendimiento del aceite

Los rendimientos de aceite obtenidos a partir de la semilla de tabaco por las diferentes técnicas de recuperación se comparan en la Tabla 1. Como se puede observar, el rendimiento de aceite dependía del tipo de la técnica de recuperación y en las condiciones de funcionamiento aplicados. El rendimiento de aceite más alto (32,9 g/100 g) se logró mediante CP de semilla de tabaco. Después del prensado del aceite, una cantidad adicional del aceite residual (3,6% de la torta de semillas, o 2,4 g de aceite por 100 g de la TS inicial) se extrajo a partir de la torta de semillas mediante el uso de n-hexano. La suma de los rendimientos de aceite obtenido por CP seguido de ME fue aceptado como el contenido de aceite en las semillas (35,3 g/100 g).

SE dio el segundo más alto rendimiento de aceite entre las técnicas empleadas. La eficiencia de la extracción de SE con respecto al contenido de aceite era

87,9%. Este rendimiento de aceite superior es un resultado de la mayor relación de semillas-a-disolvente y el proceso de extracción prolongada. Un mayor rendimiento de aceite por SE, en comparación con la obtenida por IUE, también se obtuvo de la semilla de rosa de tierra [15].

Los rendimientos de aceite de la planta semilla de tabaco obtenida por maceración y IUE eran sustancialmente más pequeños que los obtenidos por CP y SE, siendo alrededor del 50% del contenido de aceite en las semillas. Se podría especular acerca de los factores que limitan la transferencia de masa de aceite de las partículas de siembra en el extracto líquido, pero las características más importantes son el tamaño de partícula sólida, el grado de destrucción de las células y el grado de macro-mezcla. El bajo rendimiento de aceite recuperado por ME o IUE puede ser causada por la resistencia a la transferencia de masa en la mayor parte del extracto líquido y / o la destrucción de las células ineficiente. Estos supuestos fueron verificados experimentalmente, de la siguiente manera.

En primer lugar, las semillas se molieron durante 1 min y la extracción de aceite (semillas-a-disolvente relación de 1: 3 g / ml, 25 °C, 60 min) se llevó a cabo con y sin agitación y ultrasonidos. Los rendimientos de aceite obtenidos fueron los siguientes: ME 19,9 g/100 g; IUE 21,0 g/100 g; me ayudó por la agitación 21,4 g /100 g; IUE asistido por agitación 21,8 g/100 g. Este experimento mostró que la agitación mejora la extracción de aceite de las semillas molidas, aumentando el rendimiento de aceite recuperado por tanto ME y IUE en alrededor de 10 y 4%,

respectivamente. También se puede concluir que la agitación fue algo más efectivo que el ultrasonido en la mejora de la eficiencia de la extracción.

En el segundo experimento, las semillas se molieron como anteriormente, pero la trituration se repitió cinco veces (1 min cada vez, para evitar el sobrecalentamiento de las semillas), y la extracción de aceite (semillas-a-disolvente relación de 1: 3 g / ml, 25 °C, 60 min) se llevó a cabo con agitación. El rendimiento de aceite era 33,9 g/100 g (aproximadamente 96% del contenido de aceite), que era más alto que el obtenido por CP. La trituration repetida destruye eficazmente los órganos internos de semillas que contienen el aceite, facilitando la liberación de aceite desde el interior de las partículas de siembra. Además, disminuye el tamaño de las partículas de siembra, la reducción de la resistencia a la difusión del aceite desde el interior de las partículas de semillas para la mayor parte del extracto líquido. Ambos efectos de repetir la molienda mejora el rendimiento de aceite de semilla de tabaco.

En el caso DUE, el aumento de la potencia de ultrasonidos entre 5 y 50 W causó un aumento del rendimiento de aceite en más de un 20%. Esto se atribuyó a la mayor potencia ultrasónica específica que se introdujo 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 60 a 170 W no tuvo ningún efecto tanto en el rendimiento ni en la cinética de la extracción de aceite de semillas de hierba pastel [16].

Se observaron tanto los efectos positivos y negativos de la energía ultrasónica en la recuperación de cobre a partir de un mineral de óxido de [17]. En este estudio, la eficacia de la lixiviación se mejoró con el aumento de la potencia ultrasónica, alcanzando un valor máximo a una cierta potencia, mientras que se redujo con un aumento adicional de la potencia ultrasónica. El aumento de potencia ultrasónica dio como resultado la implosión más completa de las burbujas de cavitación, la creación de condiciones más extremas finales. Como consecuencia, la transferencia de masa de las partículas sólidas se intensificó y el disolvente penetra más fácilmente en los sólidos, a través de los chorros de ultrasonidos, lo que mejoró la eficiencia de la extracción. La intensidad de la cavitación podría, mas sin embargo, no se puede aumentar sin un límite, porque la disociación se produjo entre el transductor ultrasónico y la solución como la amplitud de la vibración aumentó, disminuyendo de este modo la eficiencia de transferencia de energía ultrasónica.

Un mayor rendimiento de aceite de semilla de tabaco se obtuvo por IUE a potencia anultrasonic de 2 W (0.134 W / g) que por DUE a una potencia de 5 W y 10 (0,048 y 0,096 W / g, respectivamente), como se puede ver en Tabla 1. Las mejores condiciones de extracción en el primero de los casos se atribuyeron a una mayor disipación de energía específica de ultrasonido. Sin embargo, se obtuvieron mayores rendimientos de saponina total de entre varios tipos de raíces de ginseng más bien por sonicación directa que indirecta, debido a la mayor ultrasonido específico de energía introducida en el antiguo sistema de extracción (8,2 y 3,5 W por 15 ml de disolvente y 200 mg del material de la planta, respectivamente) [18].

Los otros estudios comparativos disponibles de disolvente de extracción clásica y asistida por ultrasonidos mostraron resultados similares con respecto a los efectos de la sonicación indirecta y directa sobre la eficacia de la extracción. Vinatoru et al. mejoro el rendimiento de aceite de semillas de eneldo trituradas en un tiempo sustancialmente más corto por la acción de ultrasonidos, mientras que los rendimientos de aceite obtenidos por DUE y IUE fueron comparables [19].

Rostagno et al. determinó que IUE podría dar una eficiencia de extracción de isoflavonas de la soja similares a DUE [20]. Albu et al. mostró que el ultrasonido aumentó la eficiencia de la extracción de los antioxidantes de la hierba romero, con niveles comparables de ácido carnósico se extrae obtenidos mediante el empleo de POR y IUE [21]. Sin embargo, la energía ultrasónica suministrada realmente a los sistemas de proceso no se le dio en estos estudios.

A temperatura mayor (cerca de la temperatura de ebullición), el SE fue la técnica más eficaz en la recuperación del aceite de la semilla de tabaco de tierra, asegurando un rendimiento de aceite de 31,1 g/100 g, que era similar a la obtenida por CP. Rendimientos comparables fueron obtenidos por ME y IUE a la temperatura de ebullición (19,9 y 21,0 g/100 g, respectivamente). Este resultado se atribuyó al hecho de que la trituración de semillas fue más eficaz para la extracción de aceite que la acción de ultrasonido.

3.2 Composición de ácidos grasos

Las composiciones de los ácidos grasos en el aceite de semilla de tabaco recuperado de la semilla de tabaco de tierra por extracciones con disolvente y la

del 'aceite' de semilla de tabaco obtenido por CP de la semilla de tabaco se comparan en la Tabla 2. Independientemente de la técnica de recuperación y las condiciones de extracción, la composición de ácidos grasos en el aceite de semilla de tabaco estaba dominado por el ácido linoleico, aunque el otro ácido graso mayor (palmítico, esteárico, oleico y linoleico) estaban presentes. Mediante la comparación de las composiciones de ácidos grasos de los aceites obtenidos mediante diversas técnicas de recuperación con los publicados, se podría concluir que sólo las composiciones de ácidos grasos de los aceites obtenidos mediante DUE a la energía ultrasónica de 10 y 50 W diferían de las de los aceites recuperados todo el mundo. Estas diferencias incluyen el mayor contenido de ácido palmítico y el menor contenido de ácido linoleico en el primer caso.

Las composiciones de los ácidos grasos (oleico, linoleico y linolénico) saturados palmítico y esteárico) e insaturados totales de aceite de semilla de tabaco recuperados por SE, ME, IUE y CP fueron en los mismos rangos de 11-19% y 75-86%, respectivamente. Sin embargo, el contenido de ácido linoleico se redujo en aproximadamente un 12% cuando la potencia ultrasónica de la sonicación directa aumentó de 5 a 50 W (es decir, 0,048 a 0,481 W / g). Los contenidos totales de ácidos grasos saturados e insaturados de aceite de semilla de tabaco en las mismas condiciones se incrementaron en alrededor del 5% y se redujo en un 10%, respectivamente. Una pequeña disminución de ácidos grasos insaturados y un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados fueron observados en el caso del aceite de soja obtenido por extracción asistida por ultrasonido (energía ultrasónica específica de 0,45-0,90 W / g) utilizando n-hexano como disolvente de

extracción, el cual se explica por la oxidación de acidos grasos insaturados [22]. También se observó que el ultrasonido (0,65 W / g) afectó a la composición de acidos grasos de aceite de girasol al disminuir el contenido de ácido linoleico [23]. Debido a que se detectó un ligero aumento en los valores de dieno conjugado, así, se concluyó que la oxidación del aceite se había producido durante la sonicación [23]. La oxidación ultrasónica del aceite se atribuyó a la cavitación que afecta a los componentes estructurales y funcionales hasta el punto de la oxidación de los acidos grasos [24]. Sin embargo, la disminución de los acidos grasos insaturados y el aumento de acidos grasos saturados podría significar que la reducción de los antiguos ácidos grasos se produjo debido a la generación de hidrógeno bajo sonicación de hidrocarburos. En efecto, Mizukoshi et al. [25] informaron de que el hidrógeno se encontraba entre los productos de descomposición de hidrocarburos (de decan a hexadecano) sonolisis en atmósfera de argón.

Tabla 2. La composición de Acido Grasos%) del TSO recuperado por diferentes técnicas y condiciones de funcionamiento.									
Acido Graso	Técnicas de recuperación de aceites§								
	Aceite frio presionado (CP)	Maceración		Extracción con		Extracción con ultrasonido directo (DUE)\$			Extracción Soxhlet (SE)\$,
				ultrasonido					
				indirecto (IUE)\$					
	25 Grados	BT{	25 Grados	BT{	25 grados				
					Power (W)		Power (W)		
					2		5	10	50
Palmitico	9.10	8.50	8.52	8.26	8.40	10.71	12.23	13.99	8.42
Estearico	3.27	2.77	4.72	3.66	5.32	3.49	4.33	4.91	3.78
Oleico	13.74	12.49	14.72	12.17	14.89	13.02	15.09	16.66	11.78
Linoleico	71.01	71.28	69.97	70.21	69.19	70.19	63.95	58.03	72.22

Linoleico	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
Saturada	12.37	11.27	13.24	11.92	13.72	14.20	16.56	18.90	12.20
Unsaturada	85.45	84.7	84.7	83.27	85.2	84.02	79.82	75.40	84.84
Moniinsaturada	13.74	12.49	12.49	12.17	14.89	13.02	15.09	16.66	11.78
Poliinsaturadas	71.71	72.21	72.21	71.10	70.31	71.00	64.73	58.74	73.06

§ Las condiciones de operación se dan en la Tabla 1.

\$ Disolvente de extracción: n-hexano.

Temperatura mejorada (cerca de la temperatura de ebullición).

{BT, temperatura de ebullición.

4. CONCLUSIONES

Para la obtención de aceite a partir de la semilla de tabaco, varias técnicas de recuperación tales como SE, ME, IUE, DUE y CP fueron comparados con respecto tanto a la eficacia de la extracción, medida por el rendimiento de aceite, y la composición de Acidos Grasos. El rendimiento máximo de aceite de 35,3 g/100 g se obtuvo por un proceso de dos etapas que consiste en CP seguido por ME. En este proceso, la torta de semillas después de CP se molió y después el aceite residual se extrajo mediante el uso de n-hexano. Entre las técnicas individuales aplicadas, CP fue el más eficaz en recuperar el aceite de la semilla de tabaco, lo que garantiza un rendimiento de aceite de 93% del rendimiento máximo de aceite. Esta técnica de recuperación es más aceptable que los otros métodos, no sólo por razones económicas sino también por razones ambientales, de salud y seguridad. El rendimiento de aceite más alto se obtiene en un proceso tecnológico relativamente simple, sin producir residuos y sin utilizar disolventes potencialmente peligrosos.

ME y extracción ultrasónica son ineficientes para la recuperación de aceite de la semilla de tabaco de tierra, como los rendimientos de aceite eran entre 45 y 55% del contenido de aceite en las semillas. La eficiencia de estas técnicas de recuperación se puede aumentar por una trituración más eficaz de la semilla de tabaco y por agitación mecánica de la suspensión de la extracción. La repetición de la molienda de la semilla de tabaco seguido de maceración asistida por agitación mecánica mejoró la eficiencia de la extracción de aceite a 25 °C a un máximo de 96% del contenido de aceite en las semillas.

El principal ácido graso del aceite de las semillas de la planta de tabaco, tipo Otlja, fue el ácido linoleico (aproximadamente 70%), aunque los otros grandes ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico y linolénico) también estaban presentes. Se encontró que las composiciones del aceite de semilla de tabaco extraído por SE, ME, IUE y CP eran similares unas a otras. Sin embargo, el aceite de semilla de tabaco recuperado por DUE tenía un contenido menor de ácido linoleico en comparación con los otros aceites. Cuando hay aumento de la potencia de sonicación directa, se puede esperar un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados y una disminución en el contenido de ácidos grasos insaturados. El cambio observado del perfil de ácidos grasos por sonicación se ha explicado hasta ahora sólo por oxidación de los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, también puede ser causada por la reducción de los ácidos grasos insaturados inducida por la generación de hidrógeno a hidrocarburo sonolisis. Se necesitan más investigaciones para dilucidar más claramente el mecanismo de acción de ultrasonido en la composición ácidos grasos de los aceites.

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 Otlja, 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

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. *Turk 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.

ANEXO B

PLANTECHNO

Vicomoscano, Diciembre 9 de 2012

Plantechno es una empresa Italiana que opera como planta recombinante genética de ADN con fines energéticos.

Desde el 2005 Plantechno ha conducido pruebas industriales de energía del tabaco en Italia, en su área privada que esta localizada en el centro investigaciones en Vicomoscano (Cremona).

Plantechno ha utilizado semillas de tabaco mutagenico obtenido con el método descrito en la patente PCT/IB2007/053412.

Plantechno ha obtenido los siguientes resultados promedios:

Italia

Producción promedio de semilla por cosecha y por hectárea

Densidad planta/hectárea: 127.000

Durante nuestros años de prueba Plantechno ha probado diferentes densidades planta/hectárea y el promedio de producción por planta es de 0,40 gramos de semilla limpia y seca (humedad del 8%)

La administración

Nicola Fogher Hay firma



Vicomosciano, 9 december 2012

Plantechno is an italian company operating in plant genetic recombinant DNA for energy purposes.

Plantechno, since 2005, has conducted industrial test of energy tobacco in Italy in its private area located in the research center in Vicomosciano (Cremona).

Plantechno has utilized mutagenized tobacco seeds obtained with the method described in the patent PCT/IB/2007/053412.

Plantechno has obtained the following average results:

Italy

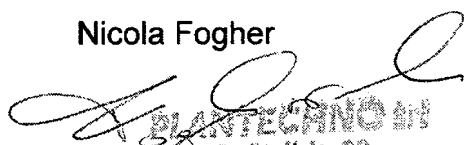
Average seed production per harvest per hectar : 5,3 T (5300 Kg)

Density plant/hectare : 127.000

During our years trial Plantechno has tested different densitiy plant/hectare and the average production per plant is 0,40 grams of seed clean and dry (humidity 8%)

The administration

Nicola Fogher


PLANTECHNO
Via Staffolo, 60
28040 VICOMOSCANO (CH)
Partita IVA 01060070194

ANEXO C

IDRO EDIL S.R.L.

Arma di Taggia, Diciembre 5 de 2012

Idroedil es una empresa Italiana que opera en el sector del manejo de desperdicios y producción de energía con recursos alternativos.

Idroedil ha conducido desde el 2010 pruebas de energía de tabaco en Italia y Tunez.

Idroedil ha utilizado semillas de tabaco mutagenizado obtenido con el método descrito en la patente PCT/IB/2007/053412.

Idroedil ha obtenido los siguientes resultados:

Italia

Promedio de producción de semilla por cosecha y por hectárea: 2.2 T (2200 KG)

Densidad planta/hectárea: 52.000

El cual es equivalente a una producción de más de 5288 KG por hectárea por cosecha si tenemos 125.000 planta/hectárea

Tunez

Promedio de producción de semilla por cosecha y por hectárea: 3.2 T (2200 KG)

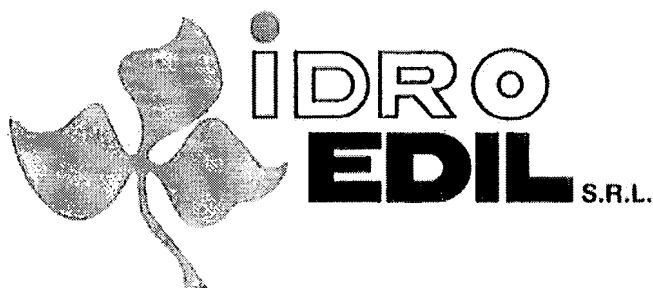
Densidad planta/hectárea: 55.000

55

El cual es equivalente a una producción de más de 7272 KG por hectárea por cosecha si tenemos 125.000 planta/hectárea.

La Administración.

Hay Firma



Arma di Taggia, 5 december 2012

Idroedil is an italian company operating in the waste managemen sector and electricity production from alternative sources.

Idroedil has conducted since 2010 industrial test of energy tobacco in Italy and Tunisia.

Idroedil has utilized mutagenized tobacco seeds obtained with the method described in the patent PCT/IB/2007/053412.

Idroedil has obtained the following results:

Italy

Average seed production per harvest per hectar : 2,2 T (2200 KG)

Density plant/hectare : 52.000

Which is equivalent to a production of more than 5288 KG per hectare per harvest if we get 125.000 plant/hectare.

Tunisia

Average seed production per harvest per hectar : 3,2 T (3200 KG)

Density plant/hectare : 55.000

Which is equivalent to a production of more than 7272 KG per hectare per harvest if we get 125.000 plant/hectare.

The administration

IDROEDIL S.R.L.
L'Amministratore

Sede Legale: Via Cristoforo Colombo 54, int. 1, Arma di Taggia (IM), Italy - www.idroedil.info

ANEXO D

Co.Se.P.A.

Padua, Diciembre 5 de 2012.

Cosepa es un consorcio agrario que opera en Italia en el sector Bioenergética

Cosepa ha logrado el cultivo a escala industrial de la energía del tabaco en Italia desde el 2011.

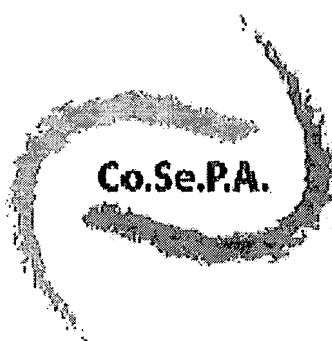
Cosepa ha utilizado semillas de tabaco mutagenizado obtenido con el método descrito en la patente PCT/IB/2007/05312.

Cosepa alcanzo un promedio de producción de semilla por cosecha por año de 2,2 T (2200 KG).

El promedio de la densidad de la planta por hectarea es de 48.000. Lo que equivale a una producción de mas de 3729 KG por hectárea por cosecha si tenemos 125.000 planta/hecatrea.

La Administracion

Hay firma



Padova, 5 december 2012

Cosepa is an agro-consortium operating in Italy in the bio-energy sector.

Cosepa has managed industrial scale cultivation of energy tobacco in Italy since 2011.

Cosepa has utilized mutagenized tobacco seeds obtained with the method described in the patent PCT/IB/2007/053412.

Cosepa reached an average production of seed per harvest per year of 2,2 T (2200 KG).
The average plant density per hectare is 48.000. Which is equivalent to a production of more than 5729 KG per hectare per harvest if we get 125.000 plant/hectare.

The administration

ANEXO E

Otjozondjupa

Otjiwarongo, Diciembre 5 de 2012

Explotaciones Otjozondjupa es una empresa de Namibia que opera en minas y el sector energético.

Hemos conducido desde el 2011 pruebas industriales de energía del tabaco en Namibia en el área de Otjiwarongo, en tierras privadas.

Hemos utilizado semillas de tabaco mutagenizadas obtenidas con el método descrito en la patente PCT/IB/2007/053412.

Hemos obtenido los siguientes resultados:

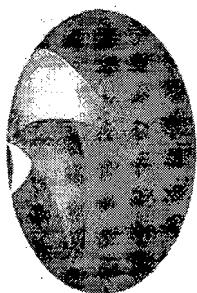
Promedio de producción de semilla por cosecha por hectárea: 3,4 T (3400 KG)

Densidad planta/hectárea: 65.000

Lo que es equivalente a una producción de mas de 6538 KG por hectárea por cosecha si tenemos 125.000 planta/hectárea.

Director Administrativo

Hay firma y sello



Otjozondjupa

Holdings (Pty) Ltd REG: 2006/422

P.O. BOX 40193 AUSSPANPLATZ, TEL: 061 300031/2/3 FAX: 061 300034

Otjiwarongo, 5 december 2012

Otjozondjupa Holdings is a namibian company operating in mines and energy sector.

We have conducted since 2011 industrial test of energy tobacco in Namibia in the area of Otjiwarongo, in our private land.

We have utilized mutagenized tobacco seeds obtained with the method described in the patent PCT/IB/2007/053412.

We have obtained the following results:

Average seed production per harvest per hectar : 3,4 T (3400 KG)

Density plant/hectare : 65.000

Which is equivalent to a production of more than 6538 KG per hectare per harvest if we get 125.000 plant/hectare.

Managing Director

[Handwritten signature]



Sede Legale: Via Cristoforo Colombo 54, int. 1, Arma di Taggia (IM), Italy – www.idroedit.info

ANEXO F

Genova, 13 de Diciembre de 2012

Dr. Milvio Avogadro

Via Nizza 6b/17

16145 Genova

Yo Milvo Avogadro, suscrito profesor de química, he pasado la mayor parte de mi vida laboral en trabajando en el campo de los lípidos.

Yo estoy ahora retirado de mi rol de profesor en la facultad de Ingeniería química de Universidad de Génova y estoy trabajando como consejero en el campo químico.

Yo trabaje personalmente con el profesor Fogher en la estandarización y preparación de muestras de semillas de tabaco para ser enviados a la estación Experimental de la industria de aceites y grasas de Milan (reporte 10LA01350) en mayo del 2010 y en abril-mayo del 2011, reporte 11LA01745.

Las semillas de muestra fueron preparadas por el profesor Fogher en el laboratorio Plantechno y siguió los siguientes métodos de limpieza:

Las capsulas que contenían las semillas fueron trituradas y la masa obtenida fueron entonces tamizadas en dos pasos con mallas tamizadoras de 0.8 mm y 0.25 mm.

De esta manera suprimimos parte de la cascara y polvo para obtener una semilla limpia.

Estas muestras despachadas a un laboratorio certificado Accredia.

La extracción de aceite de las semillas de tabaco se llevó a cabo por el método de prensado en frío

el cual se describe en WO2008/110876.

Las muestras de aceite obtenidas de este modo fueron enviados a SSOG (Estación experimental para la industria del aceite y la grasa) para el análisis químico comparativo.

La extracción química del aceite de semilla de tabaco fue llevada a cabo siguiendo el método de extracción estándar Soxhlet y puede ser resumido de la siguiente manera:

Las semillas de tabaco se muelen y se colocan dentro de un cartucho de celulosa, cargados en la cámara principal de un extractor Soxhlet.

El extractor Soxhlet se coloca por encima de un envase que contiene el disolvente de extracción (hexano). Encima de la cámara principal es conectado un condensador. El disolvente se calienta a ebullición para que los vapores puedan propagarse en el condensador. El vapor se condensa y cae de nuevo en la cámara principal que contiene el cartucho con el sólido. El condensador asegura que cualquier vapor solvente se condense y fluya en la cámara del cartucho entrando así con la matriz sólida. La cámara que contiene el cartucho con el material sólido se llena lentamente con disolvente caliente, teniendo así tiempo para difundirse en la matriz sólida. Parte del compuesto deseado se disuelve por

lo tanto en el solvente caliente y se transporta por el mismo a través del cartucho. Cuando el nivel de disolvente cargado con extracto alcanza el nivel del sifón lateral de la solución se descarga en el envase de ebullición: el disolvente se evapora de nuevo y el ciclo se repite mientras que el soluto se acumula. Este ciclo se puede repetir muchas veces, durante horas o incluso días. Durante cada ciclo, una parte del compuesto no volátil se disuelve en el disolvente.

Después de la extracción, el disolvente tiene que ser separado del extracto: esto se logra a través de un evaporador rotatorio, que opera una destilación del disolvente que se recupera nuevamente.

El extracto no soluble del sólido permanece en el cartucho y es, por lo general, descartado. El aceite de semilla de tabaco preparado de acuerdo con el procedimiento estándar de Soxhlet con hexano como disolvente se envió al laboratorio de análisis como se indico anteriormente en el informe relacionado 11LA10745.

La preparación del aceite de semilla de tabaco relacionados con el análisis 11LA01742 y 10LA01350 se llevó a cabo de la siguiente manera: La semilla se preparó con el método de limpieza descrito anteriormente, y luego se presiono directamente, (la semilla no se calentó) en una prensa elical , el aceite así extraído se filtra con un filtro.

El método de extracción utilizado corresponde al método de extracción de prensado en frío que también se describe en la aplicación de la patente WO2008/110876.

Personalmente, hice mas pruebas usando una planta industrial en la empresa COMAGRI, con prensas M.I.G: con capacidad de 70 toneladas por día.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencia significativa en cantidad o calidad de grado combustible del aceite extraído, utilizando plantas piloto.

Saludos cordiales

Milvio Avogadro

Hay firma

Genova, 13 dicembre 2012

**Dr. Milvio Avogadro
Via Nizza 6b/17
16145 Genova**

I the undersigned Milvio Avogadro, Professor of Chemistry, have spent most of my working life, working in the field of lipids.

I am now retired from my role as associated Professor at the Genoa University, faculty of Chemical Engineering and I am working as an Adviser in the chemical field.

I worked personally with Prof. Fogher in the standardization and preparation of samples of tobacco seeds to be sent to the Experimental Station for the Industries of Oils and Fats of Milan (report 10LA01350) in May 2010 and April-May 2011 11 LA01745 report.

The seed samples were prepared by Prof. Fogher in Plantechno laboratory, and he followed these cleaning methods:

The capsules containing the seeds are crushed and the mass obtained was then sieved in two stages with sieve meshes of 0.8 mm and 0.25 mm.

In this way we deleted parts of peel and powder to obtain a clean seed.

These samples were then despatched to an official laboratory certified Accredia.

The oil extraction from the tobacco seeds was carried out by the cold pressing method described in WO2008/110876.

The oil samples thus obtained were sent to SSOG (Stazione Sperimentale per le industrie degli Oli e dei Grassi) for chemical comparative analysis.

The tobacco seed oil chemical extraction was carried out following the standard Soxhlet extraction method can be summarised as follows:

The tobacco seeds are grinding and placed inside a cellulose cartridge, loaded into the main chamber of a Soxhlet extractor.

The Soxhlet extractor is placed above a flask containing the extraction solvent (hexane). Above the main chamber is connected a capacitor. The solvent is heated to boiling so that the vapours can spread in capacitor. The vapour condenses and falls back into the main chamber containing the cartridge with the solid. The condenser ensures that any solvent vapours condense and flow into the cartridge chamber thus entering in contact with the solid matrix.

The chamber containing the cartridge with the solid material fills up slowly with hot solvent which therefore has time to spread into the solid matrix. Part of the desired compound hence dissolves in the hot solvent and is transported by the same through the cartridge. When the level of solvent loaded with extract reaches the level the lateral siphon the solution is discharged in the boiling flask: the solvent evaporates again and the cycle is repeated while the solute accumulates. This cycle can be repeated many times, for hours or even days. During each cycle, a part of the non-volatile compound dissolves in the solvent.

After the extraction, the solvent has to be separated from the extract: this is accomplished via a rotary evaporator, which operates a distillation of the solvent which is then recovered.

The non-soluble extract of the solid remains in the cartridge and is, usually, discarded.

The tobacco seed oil prepared according to the standard Soxhlet procedure with hexane as solvent was then sent to the Analysis laboratory indicated above and the related report is report 11LA10745.

The preparation of the tobacco seed oil related to the analysis 11LA01742 and 10LA01350 was carried out in the following way:

The seed was prepared with the cleaning method described above, and then pressed directly, (the seed was not heated) in a elical-press, the oil thus extracted was filtered with a filter. The extraction method used corresponds to the cold pressing extraction method also described in patent application WO2008/110876.

Personally, I did further tests using an industrial plant at the company COMAGRI, presses M. I.G. capacity of 70 tonnes per day.

The results obtained showed that there was no significant difference either in quantity or quality for fuel grade, of the extracted oil using pilot plants.

Best Regards

Milvio Avogadro

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Milvio Avogadro', with a long horizontal stroke extending to the right.

ANEXO G

POTENCIAL DE PRODUCCIÓN Y ASPECTOS DE CALIDAD DEL ACEITE DE SEMILLA DE TABACO.

Proyecto micronutriente. (ICAR) Gujarat Agricultural University Anand 388110

Recibido el 20 de Mayo de 1998.

La campaña anti tabaco ha necesitado de estudios hacia los diferentes usos del tabaco y el aceite de semilla de tabaco es uno de los productos importantes de este cultivo. Para evaluar la producción potencial del aceite de semilla de tabaco dándole importancia limitada a la hoja, se sembraron diferentes tipos de tabaco en la estación de Tabaco Bidi, Anand siendo la mas densamente cultivada. Dentro de los diferentes variedades y tipo de tabaco estudiados una variedad de tabaco masticable A145 ,dio el mayor rendimiento de semilla (11171 kg/hectárea) y rendimiento de aceite (432.9 kg/hectárea). Desde el punto de vista de calidad del aceite de semilla de tabaco libre de nicotina se comparo con otras semillas. El estudio de vida útil indico que el aceite de semilla de tabaco crudo era tan bueno como el del aceite de semillas de cacahuete y algodón. Desde el punto de vista de calidad nutricional, el aceite de semilla de tabaco era mejor que el aceite de semilla de cacahuete y algodón y se compara con el aceite de semilla de cártamo. La torta de semilla de tabaco después de "la extracción del aceite, es rico en nitrógeno (alrededor del 6%), lo que podría servir como suplemento para alimento animal.

INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente conciencia de los presuntos factores de riesgo sanitario asociados al uso ambiental del tabaco los esfuerzos de investigación necesitan ser orientados hacia el uso alternativo del tabaco. Chakraborty en 1982 y Patel en 1985 reportaron que era posible hacer uso del cultivo de tabaco en la producción de varios químicos agrícolas: nicotina grado insecticida, alimento grado proteína, fertilizador grado ácido orgánico, solasanol grado farmacéutico y posiblemente furfural grado industrial. Estos químicos pueden ser recuperados de la lámina, del nervio central y del tallo de la planta de tabaco. La planta de tabaco también produce semillas ricas en aceite, Sin embargo en la producción de buena calidad de hoja masticable/fumable, nos da un resultado de semilla de tabaco no comercial. Si la producción es planeada intercambiando el cultivo de hoja por semilla en un cultivo plantado una gran cantidad de semillas y hojas para el uso de la extracción de aceite y fotoquímicos se podrían producir respectivamente.

MÉTODOS Y MATERIALES

Un experimento fue conducido en el centro de multiplicación de semilla de tabaco en Lambhavel, Anand entre 1989 y 1993 con cuatro variedades de Bidi, dos de masticable y una de tabaco rustico, se cultivaron 50.000 plantas/hectárea para el estudio de la producción potencial de semilla de tabaco, su contenido de aceite, composición química y calidad nutricional. Los cultivos fueron fertilizados con 180kg de N/hectárea y 50 kg de P205/hectárea y las semillas fueron cultivadas en rondas de dos y tres. El cultivo estuvo cerca de siete meses en el campo.

173

[illegible]

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La data experimental en promedio del rendimiento de la semilla, contenido de aceite, producción potencial de aceite y el color del aceite están representadas en la Tabla I. Se puede observas que el rendimiento de la semilla fue mas alto en ambas, la variedad de masticables y la variedad A145 que el de la variedad GT6.

El contenido de aceite de las semillas de tabaco no vario mucho entre los tipo ni dentro de las variedades. El contenido total de aceite fue entre 35 y 39 %. Somayajulu y Murti (1963) reportaron índices similares para el tabaco FCV. El calculo de producción potencial de aceite por hectárea fue la mas alta(432.9 kg) de la variedad de tabaco masticable A145.

El color del hexano del extracto de aceite de diferente tipo y variedades de tabaco fue visualmente evaluado. La gama de colores de la semilla de tabaco Bidi era café claro a café oscuro, e aceite de semilla de tabaco masticable era de café muy claro a café oscuro claro en el caso de tabaco rustica era casi negro.

Tabla 2: Producción potencial de la mayoría de las semillas de aceite en India			
Sembrado semilla de aceite	Rendimiento* KG/Hectárea	% contenido de aceite	Rendimiento Aceite @ KG/ Hectárea
CACAHUATE	936	40	262.0
MOSTAZA	845	33	278.9
SOJA	872	17	148.2
GIRASOL	753	35	263.6
SESAMO	284	45	127.8
CARCAMO	1000	30	300.0
ALGODÓN	550	12	66.0
TABACO MASTICABLE A145	1171	37	433.3
Valores tomados de Singhal 1996 @ valores calculados			

75

Las propiedades químicas de la semilla de aceite de tabaco se comparan equitativamente con el conocido aceite comestible como se muestra en la Tabla 4.

[illegible]

El índice de ácido de la semilla de aceite de tabaco fue mas alto que el de otros aceites peor mucho menos que el del aceite de semilla de girasol. Lawson (1985) reporto que el contenido por encima de 3^a 4 % de ácido libre de ácido graso resulta excesivo para el consumo de tabaco y en el sabor poco satisfactorio en el aceite de cocina medio. El rango de índice de ácido en el aceite de semilla de tabaco era de menos del 4%.

Tabla 6: Facilidad de Uso de los aceites comestibles					
Aceites	% SFA	% MUFA	% PUFA	MUFA/PUFA Índice de estabilidad	PUFA/SFA (Índice calidad nutricional)
CACAHUETE	19.0	55.0	27.0	2.03	1.42
MOSTAZA	6.0	71.0	23.0	3.08	3.83
SEMILLA DE ALGODÓN	33	24.0	40.0	0.60	1.21
GIRASOL	13.3	24.0	64.0	0.37	4.81
CARCAMO	9.0	13.0	78.0	0.16	8.66
SEMILLA DE TABACO	14.8	12.0	73.2	0.16	4.94

El estudio del almacenamiento de la semilla de aceite de tabaco se condujo por un Periodo de 10 meses para asegurar su vida útil y ser comparado con el aceite de cacahuete y el de la semilla de aceite de algodón. Un rango de incremento de peróxido fue monitoreado y los resultados se presentan en la tabla 7. Los resultados muestran hasta 8 meses una periodización lipídica de semilla de aceite tabaco estaba sobre los limites razonables y se compara con el cacahuete y mucho mejor que el aceite de semilla de algodón después el deterioro se establece en aceite de semilla de tabaco más rápido en comparación con el aceitede cacahuete. Sin embargo la degeneración fue peor en el aceite de semilla de algodón que el aceite de semilla de tabaco.

Tabla 7: Vida útil de la semilla de Tabaco comparada con las semillas de aceite de Cacahuete y Algodón							
Parámetros de Calidad	Aceite	Periodos de Almacenamiento en meses					
		INICIAL	DOS	CUATRO	SEIS	OCHO	DIEZ
ÍNDICE DE PEROXIDO	T.S.O	4.86	15.4	23.4	30.9	86.9	236.5
	G.N.O	11.34	23.2	25.2	38.4	110.1	154.8
	C.S.O	20.35	40.0	39.6	65.7	221.4	319.1
T.S.O. : Aceite de semilla de Tabaco G.N.O. Aceite de Cacahuete C.S.O. Aceite de semilla de Algodón							

CONCLUSIÓN

El crecimiento de la cosecha de Tabaco para la semilla para extraer aceite y utilizar la hoja para la extracción de fotoquímicos como la nicotina, solanesol y ácidos orgánicos ,aparentemente una proposición económica mas viable tanto como 1200kg/hectárea de semilla y 1800 kg/hectárea de khakhari podría ser producida y los ingresos están estimados alrededor de Rs 33000/hectárea (Precio de la semilla Rs 25/kg y el precio de Khahkhari Rs 2/kg. El cual se compara con el retorno económico de los cultivos de Tabaco tradicionales.

RECONOCIMIENTOS

Los autores están agradecidos al coordinador de proyectos (tabaco) y al oficial a cargo, Annad por proporcionar y facilitar todo lo necesario para llevar a cabo el experimento.

Tob. Res. 24(1): 44-9, 1998

PRODUCTION POTENTIAL AND QUALITY ASPECTS OF TOBACCO SEED OIL

J.A. PATEL, B.K. PATEL¹ AND M.K. CHAKRABORTY²

Micronutrient Project (ICAR), Gujarat Agricultural University, Anand 388 110

[Received on 20th May, 1998]

The anti-smoking campaign has necessitated studies towards the alternate uses of tobacco and the tobacco seed oil is one important product from this crop. To assess the production potential of tobacco seed oil, giving limited importance to the leaf, different types of tobaccos were grown at Bidi Tobacco Research Station, Anand as a thickly planted seed crop. Among different types and varieties of tobacco studied, a chewing tobacco variety A 145 gave the highest seed yield (1171 kg/ha) and oil yield (432.9 kg/ha). From quality view point tobacco seed oil, free from nicotine, was comparable to other oils. The shelf life study indicated that crude tobacco seed oil was as good as groundnut and cotton seed oils. From nutritional quality point of view, tobacco seed oil was better than groundnut and cotton seed oils and comparable to safflower oil. The tobacco seed cake after the extraction of oil was rich in nitrogen (around 6%), which could serve as animal feed supplement.

INTRODUCTION

Due to the growing awareness of alleged health risk factors associated with tobacco's conventional uses, research efforts need to be geared up for alternative uses of tobacco. Chakraborty *et al.* (1982) and Patel *et al.* (1985) reported that it is possible to make use of tobacco crop for

the production of several agrobased chemicals: insecticide grade nicotine, food grade protein, fertiliser grade organic acids, pharmaceutical grade solanesol and possibly industrial grade furfural. These chemicals can be recovered from the lamina, midrib and stalk of the tobacco plant. Tobacco plant also produces oil rich seeds. However, for producing good quality smoking / chewing leaf, the plant is topped resulting in no commercial supply of tobacco seed. If production planning is shifted from leaf to seed - through an untopped close planted crop, large quantity of seeds and leaf useful for extraction of oil and phytochemicals respectively could be produced.

MATERIALS AND METHODS

An experiment was conducted at Tobacco Seed Multiplication Center, Lambhavel, Anand during the years 1989 to 1993 with four varieties of bidi type, two of chewing type and one rustica tobacco type were grown with 50,000 plants/ha to study the production potential of tobacco seed, their oil content, chemical composition and nutritional quality. Crop was fertilized with 180 kg N/ha and 50 kg P₂O₅/ha and seeds were

1. Research Scientist & Head and (2) Reid. Scientist & Head, Dept. of Biochemistry, B.A. College of Agriculture, GAU, Anand - 388 110.

TOBACCO SEED OIL PRODUCTION

45

harvested in two - three rounds. The crop was nearly seven months in the field. Other agronomic practices were administered like normal tobacco crop avoiding topping and de-suckering. The oil content of tobacco seeds was evaluated by hexane extract. Saponification value, peroxide value, acid value, iodine value and nicotine content of the extracted oil were evaluated by standard methods. Fatty acid profile of extracted oil was analysed by GLC. De-oiled tobacco seed cake was analysed for total nitrogen content.

The shelf life of tobacco seed oil of variety A145 with groundnut and cottonseed oils was studied by storing the oil samples in plastic bottles under room temperature. Samples were analysed for peroxide value at 0,2,4,6,8 and 10 months intervals.

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental data on average seed yield, oil content, production potential of oil and oil colour are presented in Table 1. It may be observed that the seed yield was higher in both the chewing tobacco varieties and variety A145 produced higher seed yield than GT6 variety. The oil content of the tobacco seeds was not varying much among the types as well as in varieties. The overall oil content was between 35 to 39 per cent. Somayajulu and Murti (1963) reported similar values for the FCV tobacco. The computed production potential of oil per hectare was the highest (432.9 kg) from chewing tobacco variety A145.

The colour of the hexane extracted oil of different types and varieties of tobacco was visually evaluated. The colour range

Table 1: Seed yield, oil content and production potential of oil from different types and varieties of tobacco

Character	Types of tobacco						
	Bidi				Chewing		Rustica
	A2	A119	GT4	GT5	A145	GT6	GC1
Seed yield (kg/ha)	1018	1024	789	439	1171	1041	729
Oil content (%)	37.9	36.5	35.3	37.3	37.0	36.5	39.1
Production potential of oil (kg/ha)	386.5	373.4	313.4	163.6	432.9	383.5	285.0
Colour *	DB	DB	LB	DB	VLB	LB	B

* DB = Dark Brown, LB = Light Brown, VLB = Very Light Brown, B = Black

80

of bidi tobacco seed oil was light brown to dark brown, chewing tobacco seed oil was very light brown to light brown and in case of rustica tobacco it was almost black. tobacco seed did not have the highest oil content, it was higher than cotton seed, soybean and safflower and comparable to mustard and sunflower seed.

Production potential of A145 along with major oil seed crops grown in India presented in Table 2 reveal that the seed yield in tobacco was the highest. Although

Table 2 : Production potential of major oil seeds in India

Oil seed crop	Yield * (kg/ha)	Oil content* (%)	Oil yield @ (kg/ha)
Groundnut	936	40	262.0
Mustard	845	33	278.9
Soybean	872	17	148.2
Sunflower	753	35	263.6
Sesamum	284	45	127.8
Castor	806	42	338.5
Safflower	1000	30	300.0
Cotton seed	550	12	66.0
Chewing Tobacco (A145)	1171	37	433.3

* Values quoted from Singhal, 1996.
@ Computed values.

The chemical properties of seed oil (Table 3) include saponification value, iodine value and free fatty acid content. There was not much variation in these characteristics in seed oil from different varieties and nicotine was below the level of detection (Silicotungstic acid test). Nitrogen content of de-oiled cake was within a close range of 5.54-6.52%.

The chemical properties of tobacco seed oil compare fairly with known edible oils as given in Table 4. Acid value of tobacco seed oil was higher than other oils but much less than sunflower oil. Lawasan (1985) has reported that free fatty acid content above 3-4 per cent results in excessive smoking and unsatisfactory flavour in a cooking oil medium. The range of acid value of tobacco seed oil was less than 4 per cent.

The GLC profiles of mixed fatty acid composition presented in Table 5 indicate no varietal difference except some trace

Table 3 : Chemical properties of different varieties of tobacco seed oil and their de-oiled cake

Chemical properties	Types of tobacco						
	Bidi				Chewing		Rustica
	A2	A119	GT4	GT5	A145	GT6	GC1
Saponification value (meq/kg)	197	199	197	195	199	197	198
Iodine value	131	125	129	130	135	132	140
Acid value (Oleic acid %)	2.36	2.67	1.50	3.63	3.20	2.09	4.73
De-oiled cake	6.05	5.88	5.71	5.88	5.76	5.54	6.52
Nicotine (%)	— Not detected by silicotungstic acid —						

BACCO SEED OIL PRODUCTION

47

ble 4 : Chemical properties of certain edible oils* in comparison with those of tobacco seed oil variety A145

hemical roperties	Groundnut	Mustard	Sunflower	Safflower	Tobacco seed oil
ponification ue	188-195	172-200	188-200	186-194	199
line value	82-106	87-122	101-135	130-150	135
id value	0.02-0.6	0.26-2.53	1-25	0.15-10	3.20
etc acid %)					

Nagraj, 1995.

ble 5 : Fatty acid profile (%) of different varieties of tobacco seed oil Types of tobacco

tty acids	Types of tobacco						
	Bidi				Chewing		Rustica
	A2	A119	GT4	GT5	A145	GT6	GC1
lmitic	13.40	15.23	14.52	13.19	9.94	12.09	8.74
earic	4.18	4.80	3.28	5.29	4.75	3.96	3.98
ieic	10.89	13.20	12.70	69.45	70.69	71.07	75.10
oleic	71.50	66.73	69.45	70.69	71.25	71.07	75.10
olenic	—	—	—	—	1.44	—	1.42

antity of linolenic acid found in A145 riety of chewing tobacco and GC1 riety of rustica tobacco. It has been timed that below 5 per cent level of olenic acid would improve the quality oil (Patterson, 1989) and its level in 45 variety was within the range. oleic acid content of tobacco seed oil ried from 66-75 per cent.

compared with those of tobacco seed oil from chewing tobacco variety A145 and presented in Table 6. The data clearly show that from nutritional point of view, tobacco seed oil is superior to groundnut, mustard and cotton seed oils and compared fairly well with sunflower oil and from stability point of it matches with safflower oil.

The Oil stability index is guided by onounsaturated fatty acids) MUFA / olyunsaturated fatty acids) PUFA ratio d nutritional quality index by PUFA / aturated fatty acids) SFA ratio. These tios of various edible oils have been mputed from their fatty acid mposition given by Carrier (1978) and

The storage study of tobacco seed oil was conducted for a period of 10 months to ascertain its shelf life and compared with groundnut oil and cotton seed oil. Rate of increase of peroxide value was monitored and the results are presented in Table 7. The results show that up to eight months lipid peroxidation of tobacco

Table 6: Usability of edible oils

Oils	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	MUFA/PUFA (Stability Index)	PUFA/SFA (Nutritional Quality Index)
Groundnut	19.0	55.0	27.0	2.03	1.42
Mustard	6.0	71.0	23.0	3.08	3.83
Cotton seed	33.0	24.0	40.0	0.60	1.21
Sunflower	13.3	24.0	64.0	0.37	4.81
Safflower	9.0	13.0	78.0	0.16	8.66
Tobacco seed	14.8	12.0	73.2	0.16	4.94

Table 7 : Shelf life of tobacco seed oil compared to groundnut and cotton seed oils

Quality parameter	Oil	Storage period (Months)					
		Initial	Two	Four	Six	Eight	Ten
Peroxide value	T.S.O	4.86	15.4	23.4	30.9	86.9	236.5
	G.N.O	11.34	23.2	25.2	38.4	110.1	154.8
	C.S.O	20.35	40.0	39.6	65.7	221.4	319.1

T.S.O. : Tobacco seed oil G.N.O. : Groundnut oil C.S.O. : Cotton seed oil

seed oil is within reasonable limits and compared well with groundnut and far better than cotton seed oil and afterwards deterioration sets in tobacco seed oil faster as compared to groundnut oil. However, degeneration was worse in cotton seed oil than tobacco seed oil.

CONCLUSION

Growing the tobacco crop for seed to extract oil and utilizing the leaf for extraction of other phytochemicals like, nicotine, solanesol and organic acids, appears to be economically a viable proposition as 1200 kg/ha of seed and 1800 kg/ha of khakhari could be produced and the returns are estimated

to be Rs.33000/ha (Seed price Rs. 25/kg and "khakhari" price Rs. 2/kg). Which is comparable to the economic returns from the conventional tobacco crop.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Project coordinator (Tobacco) and Officer-in-charge (Tobacco), Anand for providing necessary facilities to carry out the experiment.

REFERENCES

Carier, J.F. 1978. Characteristics of some vegetable oils. *Sunflower Science and Technology*. pp.409.

TOBACCO SEED OIL PRODUCTION

49

- Chakraborty, M.K., B.K. Patel, M.N. Tewar, J.A. Patel and H.D. Patel. 1982. Alternative use of tobacco Raw material for agro-based industry. **Indian Tob. J.** 14:9-16.
- Lawasan, H.W. 1985. *Standards for fats and oils*. AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut. pp.46.
- Nagraj, G. 1995. *Quality and utility of oil seeds*. Directorate of Oilseeds Research, Hyderabad.
- Patel, B.K., J.A. Patel and M.K. Chakraborty. 1985. Maximisation of tobacco protein production through agronomic practices. **Tob. Res.** 11:119-26.
- Patterson, H.B.W. 1989. *Handling and storage of oil seeds, oils, fats and meal*. Elsevier Applied Science. London and New York. pp.142.
- Singhal, V. 1996. *Indian agriculture*. Indian Economics Research Centre, New Delhi. pp.361-70.
- Somayajulu, B.A.R. and K.S. Murti. 1963. Pilot plant studies on processing of tobacco seed. **Indian Oilseeds J.** 7:312-9.