

Actividad antioxidante del aceite de semillas de uva *Vitis vinifera* de la variedad Tempranillo

Oil antioxidant activity of grape seeds *Vitis vinifera* of
Tempranillo variety

M. Berradre, N. Arias, G. Ojeda de R., B. Sulbarán,
V. Fernández y J. Peña

Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química. Facultad
Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo,
Venezuela. 4012.

Resumen

En esta investigación se optimizó el tiempo de extracción para la obtención de aceite de semillas de uvas Variedad Tempranillo y posterior evaluación del contenido de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante del aceite. Para la obtención del aceite se evaluaron tres tiempos de extracción (7, 8 y 9 horas) empleando el método Soxhlet con hexano como solvente de extracción. El contenido de polifenoles totales fue determinado empleado el método Folin & Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método de decoloración del catión radical 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS^{•+}) empleando Trolox como estándar de referencia. El máximo rendimiento se obtuvo a las ocho horas de extracción con un valor de 12,79% m.m⁻¹. La concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del aceite fue 341,161 µg GAE.g⁻¹ de aceite y 9,200 µg TE.g⁻¹ de aceite, respectivamente. El aceite de semilla de uvas es una fuente potencial de antioxidantes que puede ser empleado en la industria alimentaria por sus efectos beneficiosos para la salud.

Palabras clave: aceite, semilla de uva, polifenoles y actividad antioxidante.

Abstract

The total polyphenol content was determined using the Folin & Ciocalteu and the antioxidant activity by the method of bleaching radical cation 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS^{•+}) using Trolox as a reference standard. The maximum yield was obtained at 8 hours extraction with values of 5.77 and 6.01% m.m⁻¹ for the Malvasia and Tempranillo variety respectively. The concentration of phenolic compounds, and the antioxidant activity for the

extract was 341,161 $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$ oil and 9,200 $\mu\text{g TE.g}^{-1}$ oil for the Malvasia and Tempranillo variety, respectively. The grape seed oil is a potential source of antioxidants that can be used in the food industry for its beneficial effects on health.

Keyword: oil seed grapes, polyphenol, antioxidant activity.

Introducción

En los últimos años diversos estudios han demostrado que los radicales libres son la principal causa de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurológicas (Pastrana *et al.*, 2003; Assimolopoulou *et al.*, 2005; Lansky y Newman, 2007; Maier *et al.*, 2008; Hun *et al.*, 2013; Stannerand y Weichselbaum, 2013). Se cree que los antioxidantes naturales desempeñan un papel crucial en la salud humana mediante la prevención del daño oxidativo de lípidos de importantes moléculas biológicas, como el ADN y las membranas (Parry *et al.*, 2006; Stannerand y Weichselbaum, 2013). Los antioxidantes actúan como captadores de radicales, e inhiben la peroxidación de lípidos y otros procesos que incluyen radicales libres, por lo tanto, pueden proteger el cuerpo humano contra varias enfermedades atribuidas a las reacciones de los radicales. El uso de antioxidantes sintéticos para prevenir el daño por los radicales libres se ha divulgado por la implicación de efectos tóxicos secundarios, haciendo atractiva la búsqueda de compuestos naturales antioxidantes y captadores de radicales (Yadegarinia *et al.*, 2006; Thorat *et al.*, 2013).

La uva es el cultivo más ampliamente distribuido en el mundo con una producción superior a los 68

Introduction

In the last years, different researchers have proved that free radicals are the main cause of degenerative diseases such as cancer, heart diseases and neurological diseases (Pastrana *et al.*, 2003; Assimolopoulou *et al.*, 2005; Lansky y Newman, 2007; Maier *et al.*, 2008; Hun *et al.*, 2013; Stannerand and Weichselbaum, 2013). It is believed that natural antioxidants have a crucial role on the human health preventing the oxidative damage of lipids of important biologic molecules, such as the DNA and the membranes (Parry *et al.*, 2006; Stannerand and Weichselbaum, 2013). Antioxidants act as catchers of radicals, and inhibit the peroxidation of lipids and other processes that included free radicals, thus, can protect the human body against diseases attributed to reactions of radicals. The use of synthetic antioxidants to prevent the damage by the free radicals is known by the implication of secondary toxic effects, thus, searching the antioxidant natural compounds and the catchers of radicals is attractive (Yadegarinia *et al.*, 2006; Thorat *et al.*, 2013).

Grape is the most widely distributed crop worldwide, with a production superior to 68 millions of tons in 2011 (Gazzola *et al.*, 2014). During the wine-obtaining process, an

millones de toneladas en el 2011 (Gazzola *et al.*, 2014). Durante su procesamiento para la obtención de vinos se genera un importante volumen de residuos constituidos por semillas y restos de pulpa que no han sido aprovechados adecuadamente, estos residuos contienen importantes compuestos fenólicos que pueden presentar actividad antioxidante dentro de las células del cuerpo humano, reduciendo la concentración de radicales libres (Fernandes *et al.*, 2013; Gazzola *et al.*, 2014). Esta actividad antioxidante le confiere a estos desechos un potencial importante en el área de alimentos. Entre las alternativas para el aprovechamiento de los residuos en la industria del vino se plantea su uso como materia prima para la industria aceitera venezolana, lo cual ha requerido un incremento de las importaciones de oleaginosas para satisfacer la demanda de aceites y grasas en el país (Guerra y Zúñiga, 2003).

El aceite de semilla de uva (*Vitis vinifera*) es caracterizado por un ligero sabor, con toques frutales, alta digestibilidad, alto contenido de tocoferoles (Vitamina E) y un elevado contenido de ácidos grasos insaturados, como el linoleico (Do Santos *et al.*, 2008; Pardo *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2013). La semilla puede contener un 10-15% de aceite (Beveridge *et al.*, 2005). Es rica en compuestos fenólicos, principalmente proantocianinas, potenciales antioxidantes con alta actividad antiradicalaria (Pardo *et al.*, 2009). Además contiene altas cantidades de taninos 1000 veces mayor que otros aceites de semillas de otras frutas (Palma *et al.*, 1999).

important volume of residues is generated constituted by seeds and rests of pulp that have not been seized properly, these residues constitute important phenolic compounds that might present antioxidant activity inside the cells of the human body, reducing the concentration of free radicals (Fernandes *et al.*, 2013; Gazzola *et al.*, 2014). This antioxidant activity grants these residues a very important potential in the food area. Among the alternatives for the utilization of residues in the wine industry is stated its use as raw matter for the oil Venezuelan industry, which has required an increment of oil importations to satisfy the demand of oils and fats in the country (Guerra and Zúñiga, 2003).

Grape seed oil (*Vitis vinifera*) is characterized by a light-fruit taste, high digestibility, high tocopherol content (Vitamin E) and high content of unsaturated fat acid, such as linoleic (Do Santos *et al.*, 2008; Pardo *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2013). The seed might have 10-15% of oil (Beveridge *et al.*, 2005). It is rich in phenolic compounds, mainly proanthocyanidins, potential antioxidants with high antiradical activity (Pardo *et al.*, 2009). Also, it has high quantity of tannin, 1000 times higher than other seed oils of other fruits (Palma *et al.*, 1999).

In the fruit industry antioxidants such as butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluene (BHT), Tertiary Butylated Hydroquinone (TBHQ), propyl galate, tocopherol and lecithin, being BHA and BHT the most used. However, in the last years, the interest

En la industria alimentaria se utilizan antioxidantes como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroxiquinona (TBHQ), galato de propilo, tocoferoles y lecitina, siendo el BHA y BHT los más utilizados, sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés por el empleo de antioxidantes naturales dada su efectividad, seguridad y economía (Assimopoulou *et al.*, 2004; Thorat *et al.*, 2013).

En esta investigación se optimizó el tiempo de extracción para la obtención de aceite de semillas de uvas de la variedad Tempranillo y se evaluó el contenido total de polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante total (TAC) del mismo.

Materiales y métodos

Recolección del material vegetal. Se recolectaron de forma aleatoria 150 kg de hollejo (piel) y semillas de uvas (*Vitis vinifera*) de la variedad Tempranillo (COVENIN 157:1980). La recolección de las muestras se realizó posterior al proceso de maceración (aproximadamente 8 días). Las semillas se almacenaron en bolsas plásticas para ser trasladadas al laboratorio, donde se mantuvieron bajo refrigeración a 10°C hasta ser analizadas. Las uvas fueron cosechadas en enero del año 2008 en el Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Vitivinícola (CESID-Vitícola), ubicado en el municipio Mara del estado Zulia.

Preparación de la muestra. Se realizó la separación de las semillas y hollejos (epicarpio) por tamizado

by employing natural antioxidants has increased, due to their effectiveness, security and economy (Assimopoulou *et al.*, 2004; Thorat *et al.*, 2013).

In the current research, the extraction time for obtaining oil from grape seeds of Tempranillo variety was optimized, and the content of total polyphenols (TPC) was evaluated along to its total antioxidant activity (TAC).

Materials and methods

Collection of the vegetal material. 150 kg of skin and grape seeds (*Vitis vinifera*) were collected at random from the Tempranillo variety (COVENIN 157:1980). The sample collection was done after the maceration process (approximately 8 days). The seeds stored in plastic bags to be taken to the laboratory, where kept refrigerated at 10°C until their analysis. Grapes were cropped in January 2008 at the Socialist Center of Research and Wine Growing Development (CESID-Wine growing) located in Mara parish, Zulia state.

Preparation of the sample. The separation of the seeds from the skin was done sifting until obtaining a product free of skin. Once performed this operation, seeds were dried at 25°C for eight days, later were powdered employing a commercial grinder and later were sifted in a 20-mesh sift (aperture diameter of 850 µm) following the methodology proposed by Belén-Camacho *et al.*, (2005).

Physical-chemical characterization of grape seeds. The following parameters were analyzed in the samples of grape seeds: ashes according to AOCAC 7009 (1980),

hasta obtener un producto libre de restos de hollejo. Una vez realizada esta operación las semillas fueron secadas a 25°C durante ocho días, para posteriormente ser pulverizadas empleando un molino comercial y finalmente, pasadas por un tamiz de 20 mesh (diámetro de apertura de 850 µm) siguiendo la metodología propuesta por Belén-Camacho *et al.*, (2005).

Caracterización fisicoquímica de las semillas de uva. Se analizaron los siguientes parámetros en las muestras de semillas de uvas: cenizas según AOCAC 7009 (1980), grasa AOAC 7055 (1980), humedad AOAC 7007(1900), fibra AOAC 7061 (1980) y proteína AOAC 7015 (1980).

Optimización del tiempo de extracción del aceite de semillas de uva. La extracción del aceite de semilla de uva se realizó en un equipo extractor Soxhlet, realizando extracciones sucesivas y empleando diferentes tiempos (5, 6 y 7 horas), con el fin de optimizar el tiempo de extracción para la obtención del aceite (Belén-Camacho *et al.*, 2005).

Se pesaron 50 gramos de semilla seca y pulverizada y se empleó hexano como solvente, transcurrido el tiempo de extracción, el excedente de solvente en el extracto oleoso se eliminó empleando un rotavapor a 38°C durante 30 minutos. El aceite obtenido fue almacenado en viales color ámbar de 1,5 mL de capacidad, previa eliminación del oxígeno, empleando nitrógeno como gas de arrastre.

Obtención del extracto polifenólico para la medición de polifenoles. Se pesó 1 g del aceite obtenido y se adicionaron 3 mL de una solución de CH₃OH:H₂O (90:10% v.v⁻¹),

fat AOAC 7055 (1980), humidity AOAC 7007 (1900), fiber AOAC 7061 (1980) and protein AOAC 7015 (1980).

Optimization method of the extraction time of seed grape oil.

The extraction of seed grape oil was done in an extractor equipment Soxhlet, carrying out successive extractions and employing different times (5, 6 and 7 hours), with the aim of optimizing the extraction time for obtaining the oil (Belén-Camacho *et al.*, 2005).

Fifty grams of dry and powdered seeds were weighted, and hexane was used as a solvent, after the extraction time, the remnant of the solvent in the oily extract was eliminated using rotavapor at 38°C for 30 minutes. The oil obtained was stored in vials of 1.5 mL of capacity and amber color, prior to the elimination of oxygen, employing nitrogen as dragging gas.

Obtaining of the polyphenolic extract for measuring polyphenols.

1 g of the oil obtained was weighted and 3 mL of the CH₃OH:H₂O (90:10% v.v⁻¹) solution were added, the mix agitated for 4 min using a mechanic agitator (Vortex Genieu, United States). Subsequently, it centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The methanol supernatant and the content of polyphenolic extract were divided, and the residue was thrown away. The procedure was repeated three times and the extracts were combined before its storing at 10°C in amber color jars (Bail *et al.*, 2008).

Content determination of total phenols of oil. 200 µL of the polyphenol extract were measured, and 8 mL of deionized H₂O and 0.5 mL of Folin & Ciocalteu reactive after 5

la mezcla se agito durante 4 min empleando un agitador mecánico (Vortex Genieu, United States) y posteriormente, se centrifugo durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante metanólico, conteniendo el extracto polifenólico, se separó y el residuo se descartó. El procedimiento se repitió tres veces consecutivas y los extractos fueron combinados antes de su almacenamiento a 10°C en frascos color ambar. (Bail *et al.*, 2008).

Determinación del contenido de fenoles totales del aceite. Se midieron 200 µL del extracto polifenólico, se adicionaron 8 mL de H₂O desionizada y 0,5 mL de reactivo Folin & Ciocalteu transcurrido 5 minutos, se añadió 1 mL Na₂CO₃ al 20% m.v⁻¹. La solución resultante se mezcló y dejó reposar durante 60 min en la oscuridad para posteriormente medir la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro CaryUV-50 VARIAN (Mulgrave, Victoria, Australia) (Bail *et al.*, 2008).

Actividad antioxidante total (TAC) del aceite. La actividad antioxidante se evaluó por el método ABTS reportado por Miller *et al.*, (1996) y Rice-Evans *et al.*, (1996) empleando como estándar de referencia soluciones de Trolox (Calbiochem, Dinamarca) de 2 µM, 4 µM, 6 µM y 7 µM. La generación química del radical ABTS^{•+} se realizó a partir de la reacción de una solución de ABTS (Sigma, St. Louis, Mi, USA) 7 mM con persulfato potásico (Grado analítico, JT Baker, España) 2,5 mM, ambos reactivos en una proporción de 1:1. Esta mezcla se dejó en reposo, a temperatura ambiente (± 25°C) y tapada con papel aluminio durante 16 horas antes de realizar los análisis.

minutes, 1 mL Na₂CO₃ at 20% m.v⁻¹ was added. The remnant solution was mixed and stood still for 60 min in the dark for a posterior measurement of the absorbance at 765 nm, using a spectrophotometer CaryUV-50 VARIAN (Mulgrave, Victoria, Australia) (Bail *et al.*, 2008).

Total antioxidant activity (TAC) of oil. The total antioxidant activity was evaluated using the ABTS method reported Miller *et al.* (1996) and Rice-Evans *et al.* (1996) using as reference standard Trolox solutions (Calbiochem, Denmark) of 2 µM, 4 µM, 6 µM and 7 µM. The chemical generation of the ABTS^{•+} radical was done after the reaction of an ABTS solution (Sigma, St. Louis, Mi, USA) 7 mM with potassium persulphate (Analytical degree, JT Baker, Spain) 2.5 mM and both reactive at a 1:1 proportion.

This mix was set aside at an environment temperature (± 25°C) and covered with foil paper for 16 hours before performing the analyses. Once formed the radical ABTS^{•+}, it diluted until reaching an absorbance from 0.6-0.7 to 750 nm (wave longitude of maximum absorption), which was obtained mixing approximately 160 µL of the ABTS^{•+} solution and 3000 µL of pure ethanol (degree HPLC, Merck, Darmstadt, Germany) (Kuskoski *et al.*, 2004). The radical generated was stable for a maximum period of 24h, after this time the absorbance reduced progressively. The absorbance at 750 nm (Abs radical chromophore, t_{0min}) was determined to the radical ABTS^{•+} generated, later, 40 µL or the oil polyphenolic extract were added, and the absorbance at 750 nm was

Una vez formado el radical ABTS^{•+}, se diluyó hasta alcanzar una absorbancia de 0,6- 0,7 a 750 nm (longitud de onda de máxima absorción), lo cual se logró mezclando aproximadamente 160 µL de la solución de ABTS^{•+} y 3000 µL de etanol puro (grado HPLC, Merck, Darmstadt, Germany) (Kuskoski *et al.*, 2004). El radical generado fue estable por un periodo máximo de 24 h, luego de este tiempo la absorbancia disminuyó progresivamente. Al radical ABTS^{•+} generado se le determinó la absorbancia a 750nm (Abs cromóforo radical, t_{0min}), posteriormente se añadieron 40 µL del extracto polifenólico del aceite y se midió nuevamente la absorbancia a 750 nm transcurridos 5 min (Abs. Cromóforo radical + antioxidante, t_{5min}).

La actividad antioxidante total (TAC) de la muestra se determinó de acuerdo a la ecuación:

$$TAC = (\text{Abs Cromóforo radical}) t_{0min} - (\text{Abs. Cromóforo radical + antioxidante}) t_{5min}$$

Diseño experimental y análisis estadístico. El ensayo se realizó con un diseño experimental completamente aleatorizado de mediciones repetidas. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente con el programa SPSS versión 10 para Windows, aplicando la prueba de Duncan de comparaciones múltiples, con la cual se compararon las medidas y se determinó la existencia o no de diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los resultados obtenidos en la optimización del método de extracción del aceite de semillas de uvas de la variedad Tempranillo (Montgomery, 1991).

measured again passed 5 min (Abs radical chromophore, t_{5min}).

The total antioxidant activity) of the sample was determined according to the equation:

$$TAC = (\text{Abs radical chromophore}) t_{0min} - (\text{Abs radical chromophore + antioxidant}) t_{5min}$$

Experimental design and statistical analysis. The research was carried out with a completely randomized design and replicated measurements. The data obtained was processed statistically with the SPSS software, version 10 for Windows, using multiple comparison Duncan tests, comparing the means and determining the existence, or not, of significant differences ($P < 0.05$) among the results obtained in the optimization of the extraction method of the seed grape oil of the variety Tempranillo (Montgomery, 1991).

Results and discussion

Characterization of grape seeds of the Tempranillo variety. The results of the proximal analysis done to grape seeds of the Tempranillo variety are presented on table 1.

The results obtained in this research are reported by other researchers (Guerra and Zúñiga, 2003; Morant *et al.*, 2004; Beveridge *et al.*, 2005); Belén-Camacho *et al.*, (2005); García *et al.*, (2003). Morant *et al.*, (2004) indicate that grape seeds coming from the direct harvest have very high humidity, being superior to 30% m.m⁻¹, which agrees to the results obtained in the current research.

The fat content for grape seeds was similar to the one reported by

Resultados y discusión

Caracterización de las semillas de uva de la variedad Tempranillo. Los resultados de los análisis proximales realizados a las semillas de uva de la variedad Tempranillo se presentan en el cuadro 1.

Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran dentro de los reportados por otros investigadores (Guerra y Zúñiga, 2003; Morant *et al.*, 2004; Beveridge *et al.*, 2005); Belén-Camacho *et al.* (2005); García *et al.* (2003). Morant *et al.* (2004) indican que las semillas de uvas provenientes de la cosecha directa presentan una humedad muy alta, siendo superior al 30% m.m⁻¹, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

El contenido de grasa para semillas de uvas fue similar al reportado por Beveridge *et al.* (2005), quienes señalan valores para el contenido de grasa en semillas de uva de las varie-

Beveridge *et al.*, (2005), who mention values for the fat content in grape seeds of the varieties Malbec of 10.78% m.m⁻¹; Merlot of 10.75% m.m⁻¹; Cabernet Franc of 10.29% m.m⁻¹; Syrah of 10.10% m.m⁻¹ and Cabernet Sauvignon of 11.17% m.m⁻¹; these results show the possible use of this residue of the wine producing industry as raw matter in the production of oil and its uses in the elaboration of food, cosmetic and pharmaceutical products.

The protein and fiber contents obtained for the grape seed in the current research were of 5.57% m.m⁻¹ and 25.73% m.m⁻¹ respectively, which allows inferring that this sub-product of the wine industry might be useful in the formulation of food for animals, as well as in the elaboration of protean products (Belén-Camacho *et al.*, 2005).

Optimization of the extraction time of grape seed oil. The results for the optimization time on the extraction of grape seed oil are

Cuadro 1. Caracterización fisicoquímica de las semillas de uva de la variedad Tempranillo.

Table 1. Physic-chemical characterization of grape seeds of Tempranillo variety.

Parámetro fisicoquímico	Valor promedio (% m.m ⁻¹)	C.V.
Humedad	38,08 ± 0,09	0,23
Grasa	10,08 ± 0,03	0,24
Fibra cruda	25,73 ± 0,03	0,13
Cenizas	1,13 ± 0,01	1,10
Proteínas	5,57 ± 0,04	0,68
Carbohidratos	19,41	0

± Desviación estándar; C.V. Coeficiente de variación.
Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

dades Malbec de 10,78% m.m⁻¹; Merlot de 10,75% m.m⁻¹; Cabernet Franc de 10,29% m.m⁻¹; Syrah de 10,10% m.m⁻¹ y Cabernet Sauvignon de 11,17% m.m⁻¹; estos resultados evidencian la posible utilidad de este residuo de la industria vitícola como materia prima en la producción de aceite y sus usos en la elaboración de productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos.

Los contenidos de proteína y fibra obtenidos para la semilla de uva en este estudio fueron 5,57% m.m⁻¹ y 25,73% m.m⁻¹ respectivamente, lo que permite inferir que este subproducto de la industria vitivinícola puede ser útil en la formulación de alimentos para animales, así como en la elaboración de productos proteicos (Belén-Camacho *et al.*, 2005).

Optimización del tiempo de extracción del aceite de semilla de uva. Los resultados para la optimización del tiempo de extracción de aceite de semillas de uva se muestran en el cuadro 2. El análisis estadístico de los resultados indica que existen diferencias significativas para el rendimiento de aceite en función del tiempo de extracción, sin embargo, se seleccionó el tiempo de cinco horas, con un rendimiento de 12,45% m.m⁻¹ debido a que el rendimiento obtenido con tiempos de seis y siete horas fue menor al 1% lo cual no justifica el empleo de tiempos más prolongados en función de la relación costo-rendimiento, adicionalmente, un tiempo de extracción más corto disminuye el costo de producción haciendo el proceso más rentable a escala industrial.

El rendimiento de aceite de 12,45% m.m⁻¹ obtenido en este estudio fue ligeramente superior del reporta-

presented on table 2. The statistical analysis of the results indicate that there are significant differences in the yield of oil in function of the extraction time, however, the time of five hours was selected with a yield of 12.45% m.m⁻¹ due to the yield obtained with times of six and seven hours was lower at 1%, which does not justify the employment of more extended times in function to the cot-yield relation, additionally, a shorter extraction time reduces the production cost, making the process more profitable at the industry scale.

Oil yield of 12.45% m.m⁻¹ obtained in this research was slightly higher than the reported by Beveridge *et al.*, (2005) for seeds of the varieties Malbec (10.78% m.m⁻¹); Merlot (10.75% m.m⁻¹); Cabernet Franc (10.29% m.m⁻¹); Syrah (10.10% m.m⁻¹) and Cabernet Sauvignon (11.17% m.m⁻¹). On the other hand, Guerra and Zúñiga (2003) in their research about the application of an enzymatic treatment in the oil extraction of grape seeds (*Vitis vinifera*) reported yields of 18% m.m⁻¹ of the extracted oil, which are superior to the yield obtained in the current research; this slight increment in the value reported by these authors might be due to the seeds used that research were submitted to an enzymatic pretreatment for four hours at 50°C and 60% of humidity with the aim of increasing the yield of the extracted oil.

When comparing the yield of the oil obtained in the current research to those reported by other seeds of the fruit, the fat content in the grape seeds was inferior to the "corozo" seed (53.13% m.m⁻¹) and African palm (40-52% m.m⁻¹) among others (Belén-

Cuadro 2. Rendimiento del aceite extraído de las semillas de uvas de la variedad Tempranillo.**Table 2. Yield of the oil extracted of grape seeds from Tempranillo variety.**

Muestra de semillas de uva	Tiempo de extracción (h)	Valor promedio (% m.m ⁻¹)	C.V.
1	5	12,45±0,11 ^c	0,11
2			
3			
1	6	12,59±0,20 ^b	0,19
2			
3			
1	7	12,65±0,11 ^a	0,11
2			
3			

± Desviación estándar; C.V. Coeficiente de variación; % p/p porcentaje peso sobre peso de aceite.

Letras diferentes significan diferencias significativas para $\alpha=0,05$.

do por Beveridge *et al.*, (2005) para semillas de uva de las variedades Malbec (10,78% m.m⁻¹); Merlot (10,75% m.m⁻¹); Cabernet Franc (10,29% m.m⁻¹); Syrah (10,10% m.m⁻¹) y Cabernet Sauvignon (11,17% m.m⁻¹). Por otra parte, Guerra y Zúñiga (2003) en su trabajo sobre la aplicación de tratamiento enzimático en la extracción de aceite de semillas de uva (*Vitis vinifera*) reportaron rendimientos de 18% m.m⁻¹ de aceite extraído, los cuales son superiores al rendimiento obtenido en esta investigación; este ligero aumento en el valor reportado por estos autores puede deberse a que las semillas utilizadas en dicha investigación fueron sometidas a un pre-tratamiento enzimático durante cuatro horas a 50°C y 60% de humedad con el objetivo de incrementar el rendimiento de aceite extraído. Al comparar el

Camacho *et al.*, 2005), since these are much bigger seeds than grapes, thus must have a higher quantity of oil.

Content of polyphenols (TPC) in the oil. The results obtained from the content evaluation of the polyphenol compounds of grape oil of the Tempranillo variety, are presented on table 3.

The content of total polyphenols obtained in the oil of seed grapes of the Tempranillo variety was 341.16 $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$ seed (equal to 2.124 mg GAE.g⁻¹ seed and/or 341.16 mg GAE.kg⁻¹ of oil), which is superior to the ones obtained by Bail *et al.*, (2008) who report 108 $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$ of oil (Merlot cultivar), 115.5 $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$ of oil (Cabernet Sauvignon cultivar) and 103.5 $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$ of oil (Zweigelt cultivar). Göktürk *et al.*, (2007) reported an average value of 160.95 mg GAE.kg⁻¹ of oil for oils of

rendimiento de aceite obtenido en este estudio con los reportados para otras semillas de frutos, el contenido de grasa en las semillas de uva fue inferior a la semilla de corozo (53,13% m.m⁻¹) y de palma africana (40-52% m.m⁻¹) entre, otros (Belén-Camacho *et al.*, 2005), debido a que son semillas mucho más grandes que las de uvas por lo cual deben contener una mayor cantidad de aceite.

Contenido de polifenoles (TPC) en el aceite. Los resultados obtenidos de la evaluación del contenido de compuestos polifenólicos del aceite de semillas de uva de la variedad Tempranillo se muestran en el cuadro 3.

El contenido de polifenoles totales obtenido en el aceite de semillas de uvas de la variedad Tempranillo fue de 341,16 µg GAE.g⁻¹ semilla (equivalentes a 2,124 mg GAE.g⁻¹ semilla y/o 341,16 mg GAE.kg⁻¹ de aceite), el cual es superior a los obtenidos por Bail *et al.* (2008) quienes reportan 108 µg GAE.g⁻¹ de aceite (cultivar Merlot), 115,5 µg GAE.g⁻¹ de aceite (cultivar Cabernet Sauvignon) y 103,5 µg

seeds cropped in different geographic areas of Turkey, lower to the ones obtained in the current research.

However, the values of the current research are similar to those indicated by Maier *et al.*, (2009) and Poudel *et al.*, (2008) who mentioned values of 359.3 mg GAE.kg⁻¹ of oil and 2.124 mg GAE.g⁻¹ seed in oils obtained after grape fruits cropped in Germany and different regions of Japan, respectively. These differences might be attributed to the difference in the content and the proportion of polyphenolic compounds present in the extracted oil, which is related to different factors such as: the variety of the grape, the environmental factors, agriculture techniques applied during the harvest, among others (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

Total antioxidant activity (TAC). The results obtained for the total antioxidant activity are shown on table 3. The value obtained during the antioxidant activity in the oil of grape seeds of the Tempranillo variety was 9.20 µg equal to TROLOX (TE).g⁻¹. The results obtained in the current

Cuadro 3. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante del aceite de semillas de uva de la variedad Tempranillo.

Table 3. Total phenol content and the antioxidant capacity of the oil of grape seeds of the Tempranillo variety.

Muestra	CTP (µg GAE.g ⁻¹)	C.V.	AA (µg TE.g ⁻¹)	C.V.
Aceite de semillas de uva variedad Tempranillo	341,161±0,004	0,460	9,200±0,050	0,049

± Desviación estándar; C.V. Coeficiente de variación; CTP. (µg GAE.g⁻¹) polifenoles totales expresados en µg de equivalente de ácido gálico por gramos de aceite; A.A. Capacidad Antioxidante expresada en µg de equivalente de Trolox por gramos de aceite. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

GAE.g⁻¹ de aceite (cultivar Zweigelt). Göktürk *et al.* (2007) reportaron un valor promedio de 160,95 mg GAE.kg⁻¹ de aceite para aceites de semillas cultivadas en diferentes zonas geográficas de Turquía, menores a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, los valores de este estudio son similares a los indicados por Maier *et al.* (2009) y Poudel *et al.* (2008) quienes señalan valores de 359,3 mg GAE.kg⁻¹ de aceite y 2,124 mg GAE.g⁻¹ semilla en aceites obtenidos a partir de semillas de uvas cultivadas en Alemania y varias regiones de Japón, respectivamente. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la diferencia en el contenido y la proporción de compuestos polifenólicos presentes en el aceite extraído, lo cual está relacionado con diferentes factores como lo son: la variedad de uva, los factores ambientales, las técnicas agrarias aplicadas durante la cosecha, entre otros (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

Actividad antioxidante total (TAC) en el aceite. Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante total se muestran en el Cuadro 3. El valor obtenido de la actividad antioxidante en el aceite de semillas de uva de la variedad Tempranillo fue de 9,20 µg equivalentes de TROLOX (TE).g⁻¹. Los resultados obtenidos en este estudio fueron superiores a los valores obtenidos para aceites de semillas de uva de diferentes variedades: 0,87 µgTE.g⁻¹ (cultivar Merlot) 1,16 µgTE.g⁻¹ (cultivar Cabernet Sauvignon) y 0,72 µgTE.g⁻¹ (cultivar Zweigelt) reportado por Bail *et al.* (2008), lo cual puede estar relacionado con un mayor contenido de compuestos polifenólicos en los aceites

research were superior to the values obtained for the oil of grape seeds of the different varieties: 0.87 µgTE.g⁻¹ (Merlot cultivar) 1.16 µgTE.g⁻¹ (Cabernet Sauvignon cultivar) and 0.72 µgTE.g⁻¹ (Zweigelt cultivar) reported by Bail *et al.*, (2008), which might be related to a higher content of polyphenol compounds in the oils obtained in this research; additionally, this might be due to factors such as: grape variety, production area, weather, agricultural techniques with an effect on the total phenol content and at the same time the antioxidant activity (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

Conclusions

The physic-chemical characterization of grape seeds of the cultivar is in the interval reported in similar researches; the variations observed are related to weather and agronomic factors of the crop.

In function of the total polyphenols content obtained and the total antioxidant activity, the oil of grape seeds of Tempranillo variety is a potential source of natural antioxidants that might be employed in the food industry by its beneficial effect for the health.

Acknowledgement

The authors thank the Socialist Center of Research and Wine Producing Development (CESID-Wine Producing) of Zulia state, by the help provided and the supply of the samples.

End of english version

obtenidos en esta investigación, adicionalmente puede deberse a factores tales como: variedad de uva, el área de producción, la añada, la climatología, técnicas agrícolas que tienen un efecto sobre el contenido de fenoles totales y a su vez sobre la actividad antioxidante (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

Conclusiones

La caracterización fisicoquímica las de semillas de uvas de la cultivar se encontró entre los intervalo reportado en estudios similares, las variaciones observadas están asociadas a factores climáticos y agronómicos del cultivo.

En función del contenido de polifenoles totales obtenido y la actividad antioxidante total, el aceite de semillas de uva variedad Tempranillo es una fuente potencial de antioxidantes naturales que puede ser empleado en la industria alimentaria por sus efectos beneficiosos para la salud.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Vitivinícola (CESID-Vitícola), del estado Zulia por el asesoramiento y el suministro de las muestras.

Literatura citada

- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Chemists. 1980. 13ª edición. Washington, DC Estados Unidos de America. Association of Official Analytical Chemists. pp. 125-133.
- Assimolopoulou, A., S. Zlatanov y V. Papageorgiou. 2005. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chem.*, 92: 721-727.
- Bail, S., G. Stuebiger, S. Krist, H. Underwaterny y G. Buchbauer. 2008. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem.*, 108:1122-1132.
- Belén-Camacho, D., I. López, D. García, M. González, M. Moreno-Álvarez y C. Medina. 2005. Evaluación fisicoquímica de la semilla y del aceite de corozo (*Acrocomia aculeata Jacq.*). *Grasas y aceites* 56:311-316.
- Beveridge, T., B. Girard, T. Kopp y J. Drover. 2005. Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal Effects. *Food Chem.*, 53:1799-1804.
- COVENIN 1980. Norma venezolana 1576. Toma de muestras. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela.
- Dos Santos Freitas, L., R. Assis, M. Francois, A. Loviane da Silva y E. Bastos. 2008. Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *J. Chromatogra.*, 1200: 80-83
- Fernández-Pachón, S., D. Villaño, A. Troncoso y M. García-Parrilla. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *ALAN.*, 5:1-26.
- Fernandes, L., S. Casal, R. Cruz, J. Pereira y E. Ramalhosa. 2013. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Res In.*, 50: 161-166
- García, D., A. Vitoria-Matos, D. Belén y M. Moreno-Álvarez. 2003. Características fisico-químicas y composición de ácidos grasos del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubís glaucus Benth*). *Grasas y aceites* 54:259-263.

- Gazzolaa, D., S. Vincenzi, L. Gastaldona, S. Tolin, G. Pasini y A. Curioni. 2014. The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) seed endosperm: Fractionation and identification of the major components. *Food Chem.*, 155: 132–139.
- Göktürk, N., B. Gülcan y E. Sema. 2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites* 58:29-33.
- Guerra, E. y M. Zúñiga. 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinifera*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites* 54:53-57.
- Hun, J., T. Khor, L. Shu, S. Zheng-Yuan, F. Fuentes y T. Kong. 2013. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Therapeut.* 137, 153–171.
- Kuskoski, E., A. Asuero, M. García-Parrilla, A. Troncoso y R. Fett. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianícos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 24:691-693.
- Lansky, E. y R. Newman. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 109: 177-206.
- Maier, T., A. Schieber, D. Kammere y R. Carle. 2008. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.*, 112:551-559.
- Miller, N., C. Rice- Evans, M. Davies, V. Gopinathan y A. Milner. 1996. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.*, 84: 407- 412.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F., México. pp 67-69.
- Morant, A., R. Miranda y N. Salomon. 2004. Procesamiento y análisis de semilla. Universidad Nacional del Sur de Argentina. pp. 4-6.
- Palma, M. y L. Taylor. 1999. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis from antimicrobial and agrochemical activities. *Food Chem.*, 47:5044-5048.
- Pardo, J., E. Fernández, M. Rubio, A. Alvarruiz y L. Gonzalo. 2009. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111:188–193
- Parry, J., L. Su, J. Moore, Z. Cheng, M. Luther, J. Rao, J. Wang, J. y L. Yu. 2006. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *Food Chem.*, 54: 3773-3778.
- Pastrana-Bonilla, E., C. Akoh, S. Sellappan y G. Krewer. 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of mucadine grapes. *Food Chem.*, 51:5497-5503.
- Poudel, P., H. Tamura, I. Kataoka y R. Mochioka. 2008. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *J. Food Compos Anal.*, 21:622–625.
- Rice- Evans, C., N. Miller, y G. Papaganda. 1996. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.*, 26: 933-956.
- Stannerand, E., E. Weichselbaum. 2013. Antioxidants Encyclopedia of Human Nutrition, Volume 1, Elsevier Ltd, E.E.U.U, 88-99.
- Thorat, I., D. Jagtap, D. Mohapatr, D. Joshi, R. Sutar y S. Kapdi, 2013, "Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications", *International Journal of Food Studies*, 2, 81-10.
- Yadegarinia, D., L. Gachkar, M. Bagher, M. Taghizadeh, S. Alipoor y I. Rasooli. 2006. Biochemical activities of iranian mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. *Phytochemistry* 67:1249–1255.