

Caracterización físico-química del aceite de semillas de uva extraído con solvente en frío

Physicochemical characterization of grape (*Vitis vinífera*), seed oil by solvent cold extracted

P.B. Navas H.

Instituto de Química y Tecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay. Venezuela

Resumen

En esta investigación se caracterizó el aceite de semillas de uva (*Vitis vinífera*), obtenido por extracción con solvente en frío. Las semillas que consistieron de mezclas de las variedades tempranillo, merlot y syrah fueron molidas y fraccionadas a distintos tamaños de partículas, el aceite obtenido a partir de éstas fue analizado mediante parámetros físico-químicos (índice de refracción, índice de yodo, densidad y viscosidad), índices de calidad (acidez libre, índice de peróxidos y absorbancia en el ultravioleta k_{232} y k_{270}), composición en ácidos grasos y contenidos en tocoferoles, tocotrienoles y fitoesteroles. Los resultados mostraron valores de índice de yodo, densidad y viscosidad dentro de los intervalos establecidos por la literatura para aceite de semillas de uva, mientras que el índice de refracción resultó ligeramente inferior. En cuanto a los índices de calidad, los valores en todos los casos se encuentran por debajo del límite máximo permitido por el Codex Alimentarius. En el perfil de ácidos grasos destaca el elevado contenido del ácido linoleico y la presencia de ácidos grasos de cadena larga como los ácidos araquídico, gadolénico y behénico solo en las harinas de fracciones más finas. En el contenido de tocoferoles y tocotrienoles resalta el α y γ tocotrienoles, con valores de 205,2 a 213,1 y 256,6 a 395,8 mg.kg⁻¹ para cada isómero, respectivamente. En la composición de fitoesteroles resultó mayoritario el β sitosterol, con valores promedios de 63%.

Palabras clave: aceite de semillas de uva, extracción por solvente, ácidos grasos, tocoferoles, fitoesteroles.

Abstract

The grape (*Vitis vinífera*), seed oil obtained by cold solvent extraction was characterized in this study. The seeds, taken from a mixture of "Tempranillo", "Merlot" and "Syrah" varieties, were milled and sieved to a different particle sizes to obtain several flour fractions. Oil from each fraction was extracted and not subjected to any further refining process. Physical and chemical determination such as refraction index, viscosity, density and iodine value were carried out. The quality indexes like free fatty acids, peroxide value and radiation absorption in the UV region (k_{232} and k_{270}). Mayor and minor constituents (fatty acids composition and contents of tocopherols, tocotrienols and phytosterols) were also determined. Results showed good agreement of the physical and chemical parameters with the data reported in the literature for other grape seed oils. The quality indexes were below the lowest limit indicated by the Codex Alimentarius for this kind of edible oil. The main fatty acid was the linoleic acid, with the presence of the long chain arachidic, gadolenic and behenic acids. The most important tocopherol isomers were the α and γ tocotrienols with values that ranged between, 205.2 – 213.1 and 256.6 – 395.8 mg.kg⁻¹ respectively. As in many other vegetable oils, the β sitosterol (63%) was the most abundant phytosterol.

Key words: grape seed oil, solvent extraction, fatty acids, tocopherols, phytosterols.

Introducción

Desde hace mucho tiempo se han enfocado esfuerzos en la búsqueda de fuentes alternativas de productos tradicionales, como aceites y proteínas. En este sentido y debido al costo casi inapreciable de la materia prima, pues constituye un subproducto de la industria vinícola, las semillas de uva, también llamadas pepitas de uva, representan una buena fuente de estos productos, especialmente de aceite. En la actualidad, las semillas de uva se desechan o se emplean directamente o en mezclas con otros materiales para la fabricación de abono; sin embargo, la calidad de estas semillas merece un uso más adecuado, por ejemplo Matthäus *et al.*, 2008; señala que las

Introduction

Looking for alternative sources of traditional products like oils and proteins, different efforts has been carried out long time ago. Due to the almost negligible cost of raw material, representing a wine industry by-product, the grape seeds constitute a good source of these products, especially oil. Nowadays, grape seeds are rule out or directly used with other materials to make manure; however, the quality of these seeds deserve a more adequate use; Matthäus (2008) establish that grape seeds have considerable quantities of phenolic compounds which have anti-oxidant properties with positive effects on the oxidative stress. One alternative for

semillas de uva contienen cantidades considerables de compuestos fenólicos, los cuales poseen propiedades antioxidantes con efectos positivos sobre el estrés oxidativo. Una alternativa para su aprovechamiento industrial consistiría en la extracción del aceite presente, utilizando procedimientos tecnológicos existentes en la industria aceitera, es decir, por procesos mecánicos o por extracción química con disolventes no polares. En ambos casos se obtiene un aceite que desde el punto de vista nutricional y terapéutico destaca por su alto contenido en ácido linoleico (ácido que participa en la síntesis de prostangladinas) y niveles bajos de colesterol, por lo que su consumo reduciría el riesgo de desarrollar problemas cardíacos y circulatorios (Beveridge *et al.*, 2005). En la industria de los cosméticos, el aceite de pepitas de uva también es muy utilizado en la fabricación de productos humectantes de piel, por lo que no solo, la industria alimentaria se beneficia de las cualidades de este aceite.

En el presente trabajo se caracterizó el aceite de semillas de uva extraído por solvente en frío, mediante parámetros físico-químicos, índices de calidad, composición en ácidos grasos y componentes minoritarios como tocoferoles, tocotrienoles y fitoesteroles.

Materiales y métodos

Materia prima

Se utilizó mezclas de semillas de uva de tres variedades tintas españolas: tempranillo, Merlot y syrah, procedentes de las bodegas Navarro-López, Valdepeña, España.

its industrial use would be the oil extraction, using technological procedures in the oil industry, by mechanical processes or by chemical extraction with no polar solvents. In both cases, an oil that detach by its high content on linoleic acid (acid involved on prostangladyne synthesis) and low cholesterol levels from the nutritional point of view, thus, its consumptions would reduce the risk of developing cardiac and circulatory problems (Beveridge *et al.*, 2005). In cosmetic industry, the oil from seeds oil is also very used to make skin moisturizing products, thereby, not only the feed industry takes advantage from the oils qualities.

In this research, oil from grape seeds by cold solvent extraction, through physical and chemical parameters, quality indexes, fatty acids composition and minor components like tocopherols, tocotrienols and phytosterols were characterized.

Materials and methods

Raw material

Mixing of three varieties grape seeds were used: "Tempranillo", "Merlot" and "Syrah", coming from Navarro-López winery, Valdepeña, Spain.

Milling and relative abundance

Seeds were milled on an electric grinder mark Moulinex, at more fine position. Material obtained was sieved to different particle sizes using laboratory metallic sieves mark Filtra, obtaining five flour fractions more those corresponding to the complex

Molienda y Abundancia relativa

Las semillas fueron molidas en un molinillo eléctrico marca Moulinex, en la posición de molido mas fino. El material obtenido fue tamizado a diferentes tamaños de partículas, utilizando tamices metálicos de laboratorio, marca filtra, obteniéndose cinco fracciones de harina más la correspondiente a la fracción completa (cuadro1). Las harinas fueron sometidas a un proceso de secado en estufa a 60°C durante 1, 2, 5 y 8 horas.

Rendimiento graso porcentual por extracción en frío con éter dietílico

Una masa de 150 g de harina de cada fracción fue colocada en frascos de color ámbar, posteriormente, se les añadió 300 mL de dietileter (Merck grado analítico). Las suspensiones se colocaron en agitación continua en una mesa de agitación por 24 horas, luego se filtraron en papel jarabe, obteniéndose así una disolución. Posteriormente, el di-

fraction (table 1). Flours were dried to 60°C during 1, 2, 5 and 8 hours.

Percentage fat yield by cold extraction with diethyl ether

One mass of 150 g flour of each fraction was placed in flasks of amber color, after that, 300mL of diethyl ether (Merck analytical degree) were added. The suspensions were placed in continue agitation during 24 hours, after they were filtered on a syrup paper, being obtained a dissolution. Dissolvent was evaporated in a rotavapor Buche- B 480 with water bath to environmental temperature. Oil obtained was stored in amber color vials and refrigerated until its physical and chemical characterization.

Percentage fat yield by Soxhlet method

A mass of 20 g flour was placed in the equipment Soxhlet, which is placed on refrigerant tube and approximately 30 to 50 mL of petroleum ether (Merck analytical

Cuadro 1. Abundancia relativa y rendimiento graso de las distintas fracciones de harinas.

Table 1. Relative abundance and fatty yield of different flour fractions.

Fracción	Diámetro de partículas (mm)	Abundancia relativa (%)	Rendimiento graso (%)	
			Soxhlet	Éter dietílico
A	1,0 - 0,6	48,9	5,09±0,60	6,01±0,50
B	0,6 – 0,4	27,6	16,58±0,85	16,13±1,05
C	0,4 – 0,25	19,3	8,10±0,75	11,27±1,07
D	0,25 – 0,125	2,6	5,51±0,32	7,48±0,71
E	< 0,125	1,4	6,70±0,39	6,21±0,57
F	Harina fracción completa	100	8,50±0,61	9,51±0,71

solvente fue evaporado en un rota vapor Buche- B 480 con baño de agua a temperatura ambiente. El aceite obtenido fue almacenado en viales de color ámbar y en refrigeración hasta su caracterización físico- química.

Rendimiento graso porcentual por el método soxhlet

Una masa de 20 g de harina fue colocada en el cuerpo del equipo soxhlet, éste se coloca en el tubo refrigerante y se agregan aproximadamente 30 a 50 mL de éter de petróleo (Merck grado analítico) y se extrae por seis horas, al finalizar el tiempo se retira el matraz que contiene aceite mas disolvente, se lleva a estufa a 100°C con lo que se evapora el solvente (Norma Española, 2002).

El rendimiento graso en las distintas fracciones de harina seca (RGMS%) se calculó mediante la fórmula:

$$RGMS(\%) = \frac{P(mt + g) - P(mt)}{P(ms)} \times 100$$

Donde $P(mt+g)$ es el peso del matraz con la grasa extraída (g), $P(mt)$ el peso del matraz seco y vacío y $P(ms)$ el peso de muestra seca (g) empleado en la extracción.

Determinaciones Analíticas Parámetros físico-químicos:

Se aplicaron los siguientes métodos de la AOAC (1990): índice de refracción 921.28, índice de yodo 920.158, densidad 920.212 y la viscosidad se determinó con un viscosímetro Brookfield DV-II+ Pro.

Índices de calidad:

Para las determinaciones de los índices que indican la calidad de un aceite, se siguió la metodología descrita en los siguientes reglamentos:

degree) are added and it is extracted during six hours, when time finish the flask with the more dissolvent oil is move away, it is heated to 100°C which evaporates solvent (Norma Española 2002).

The fatty yield in different dry flour fractions (RGMS%) was estimated through the formula:

$$RGMS(\%) = \frac{P(mt + g) - P(mt)}{P(ms)} \times 100$$

where $P(mt+g)$ is the flash weight with fat extracted (g), $P(mt)$ the weight of dry and empty flash $P(ms)$ the weight of dry matter (g) used in extraction.

Analytical determinations

Physical and chemical parameters

The following methods of the AOAC (1990) were applied: refraction index 921.28, iodine index 920.158, density 920.212 and viscosity were determined with viscosimeter Brookfield DV-II+ Pro.

Quality indexes

For indexes determinations showing oil quality, the following methodology was used:

Acidity index: Commison of the European Community. Regulation 2568/91. Anexo II (Commision of the European Community, 1991).

Peroxides index: (IP): Commison of the European Community. Regulation 2568/91. Anexo III (Commision of the European Community, 1991).

Absorbânce in ultra violet (k_{232} , k_{270}): Commison of the European Communitis. Regulation 2568/91. Anexo IX (Commision of the European Community, 1991).

Índice de Acidez: Commision of the European Communitis. Regulation 2568/91. Anexo II (Commision of the European Communitis, 1991).

Índice de peróxidos (IP): Commision of the European Communitis. Regulation 2568/91. Anexo III (Commision of the European Communitis, 1991).

Absorbância en el ultravioleta (k_{232} , k_{270}): Commision of the European Communitis. Regulation 2568/91. Anexo IX (Commision of the European Communitis, 1991).

Las determinaciones de los parámetros físicos-químicos e índices de calidad se realizaron por triplicado.

Perfil de ácidos graso

La composición en ácidos grasos de los triacilgliceroles se expresó como porcentaje de área de sus éteres metílicos. El protocolo seguido para la formación de los éteres metílicos en frío se determinó según la metodología de la (AOCS, 1998), correspondiente al Reglamento Europeo, EU 796/2002 (Commision of the European Communitis, 2002). En la determinación se utilizó un cromatógrafo de gas Agilent serie 6890, equipado con inyector automático (Agilent 7863) y detector de ionización de llama (FID). La columna capilar empleada en la separación está recubierta interiormente de una película de 0,25 mm de espesor de la fase SGL-1000 (polietilenglicol acidificado), con una longitud de 50 m y un diámetro interno de 0,25 mm. Como gas portador se empleó helio con un flujo de 1 mL.min⁻¹, el volumen de inyección de muestra fue de 1 mL y la relación de split es 50:1. Durante el análisis la temperatura del inyector y el detector fue de 250°C y el horno se mantuvo a 210°C.

Determinations of physical and chemical parameters and quality indexes were made by triplicate.

Fatty acid profile

The composition in fatty acids of triacylglycerols was expressed like area percentage of its methyl ether. Protocol followed for the cold methyl ether formation was determined according AOCS methodology (2), corresponding to the European rule, EU 796/2002 (Commision of the European Community, 2002). A gas chromatograph Agilent serial 6890 equipped with automatic injector (Agilent 7863) and flame ionization detector (FID) was used in determination. The capillary column used in separation is recovered by its interior by a particle of 0.25 mm thickness of phase SGL-1000 (acidified polyethylenglycol), with a length of 50 m and a internal diameter of 0.25 mm. Like carrier gas, helium was used with a flux of 1 mL min⁻¹, the volume of simple injection was 1 mL and the split relationship is 50:1. During the analysis the injector and detector temperature was 250°C and furnace was maintained to 210°C.

Composition in tocopherols and tocotrienols

The composition of tocopherols and tocotrienols was done by liquid chromatography (HPLC), according AOCS method, Ce 8-89. (AOCS, 1998). Equipmnet used for separation and quantification of tocopherols and tocotrienols was a liquid chromatograph *Agilent* of serial 1100 connected to a fluorescence detector *Thermo Finnigan* model FL3000 and column used (250 x 4.6 mm) is Lichrosorb Si-60 refill of 5 mm

Composición en tocoferoles y tocotrienoles

La composición de tocoferoles y tocotrienoles se realizó por cromatografía líquida (HPLC), según el método de la AOCS, Ce 8-89 (AOCS, 1998). El equipo empleado para la separación y cuantificación de los tocoferoles y tocotrienoles fue un cromatógrafo de líquidos *Agilent* de la serie 1100 acoplado a un detector de fluorescencia *Thermo Finnigan* modelo FL3000 y la columna utilizada (250 x 4,6 mm) es de relleno Lichrosorb Si-60 de 5 mm (*Sugerlabor Madrid*). La fase móvil que se emplea en la separación es una mezcla de n-hexano-isopropanol 98,5:1,5 (v/v) con un flujo de 1 mL.min⁻¹, y un volumen de inyección de 20 mL. Para la detección mediante fluorescencia se empleó una longitud de onda de excitación de 290 nm y una longitud de onda de emisión de 330 nm.

Composición en esteroides

La composición en esteroides se determinó a partir de la fracción de grasa insaponificable de 5,0 g de aceite, según el procedimiento descrito en el Anexo V de la Regulation N° 2568/91 Commision of the European Communitis (1991). En la preparación de la muestra, se pueden diferenciar varias etapas como la preparación de la fracción insaponificable, seguido de su extracción, luego separación de los esteroides por cromatografía en capa fina y preparación de los trimetilsilil derivados y finalmente, separación de los silil derivados por cromatografía de gases en columna capilar y su cuantificación. El equipo utilizado para la separación de los silil derivados de los esteroides es un

(*Sugerlabor Madrid*). The mobile phase used in separation is a mixture of n-hexane-isopropanol 98.5:1.5 (v/v) with a flux of 1 mL.min⁻¹, and a volume of injection of 20 ml. For detection by fluorescence, a wave length of excitation of 290 nm and an emission wave length of 330 nm were used.

Sterols composition

The sterols composition was determined from the unsaponifiable fatty fraction of 5.0 g oil, according to the procedure described in the Attach V of Regulation N° 2568/91 Commision of the European Communitis (1991). In sample preparation, it is possible to differentiate several stages like the preparation of unsaponifiable fraction, followed by its extraction, after sterols separation by thin layer chromatograph and preparation of trimethylsilyl derived and finally, separation of silyl derived by gases chromatograph in capillary column and its quantification. Equipment used for silyl derived separation from sterols is a gases chromatograph HP5890, provided with an automatic injector HP7673 and a flame ionization detector (FID). The column used, is of type SGL-5 (5% diphenylmethylsilicone), of 25m length, 0.25 mm of internal diameter and 0.25µm of phase thickness. The chromatographic conditions were formed by carrier gas helium, flux through column of 1.2 mL min⁻¹, injector temperature 280°C, detector temperature 290°C and isotherm furnace to 260°C.

Statistical analysis

The statistical treatments were accomplished by an analysis of

cromatógrafo de gases HP5890, dotado con un inyector automático HP7673 y un detector de ionización de llama (FID). La columna empleada, es del tipo SGL-5 (5% difenilmetilsilicona), de 25m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25µm de espesor de fase. Las condiciones cromatográficas consistieron de gas portador helio, flujo a través de la columna de 1,2 mL.min⁻¹, temperatura del inyector de 280°C, temperatura del detector 290°C y horno isoterma a 260°C.

Análisis estadístico

Los tratamientos estadísticos se realizaron mediante un análisis de varianza, aplicando la prueba de Duncan con un nivel de significación del 95% (P<0,05), utilizando el programa SPSS 11.5 para Windows.

Resultados y discusión

Abundancia relativa y rendimiento graso para las distintas fracciones de harina

El cuadro 1, muestra que aproximadamente la mitad del material obtenido de la molienda estuvo constituido por partículas con tamaños entre 1,0 y 0,6 mm. La proporción de las restantes fracciones disminuye con el tamaño de partículas, hasta alcanzar el 1,4% en la fracción E. Asimismo, el rendimiento graso no fue homogéneo entre las distintas fracciones de harinas, encontrándose la menor cantidad de aceite en la fracción mas abundante (fracción A), que está constituida principalmente por el material leñoso proveniente de las capas externas de las semillas (Galán *et al.*, 1986). Por otro lado, se observó que la ma-

variance, applying the Duncan test with a significance level of 95% (P<0.05), using the SPSS program 11.5 for Windows.

Results and discussion

Relative abundance and fat yield for different flour fractions

A table 1 show that approximately the half of material obtained from milling was formed by particles with sizes between 1.0 and 0.6 mm. The proportion of the other fractions decrease with the particles size, until reach 1.4% in fraction E. Likewise, The fatty yield was not homogenous between the different flour fractions, being found the low oil quantity in the more abundant fraction (A), mainly constituted by the wood material coming from external seed layers (Galán *et al.*, 1986). Moreover, it was observed that the higher oil part was accumulated in fractions B and C, representing 27.04%. In relation to the more thin fractions (D and E) where the endosperm predominates, yields were lower. Respect to fatty yield, the complete fraction (F), value obtained was 9.51±0.75; result within the interval reported by Matthäus, (2008). In the same table, the oil percentages for all the flour fractions are included, obtained by the Soxhlet method (official reference method). Fatty yields found by both extraction methods are similar and even in some cases, yields for the cold extraction with diethyl ether is superior to those obtained by Soxhlet method which shows that the extraction method applied is efficient.

yor parte del aceite estuvo acumulada en las fracciones B y C, representando alrededor del 27,04%. En cuanto a las fracciones mas finas (fracciones D y E) donde predomina el endospermo, los rendimientos fueron mas bajos. En lo que respecta al rendimiento graso para la fracción completa (fracción F) el valor obtenido fue de $9,51 \pm 0,75$; resultado que se encuentra dentro del intervalo señalado por Matthäus *et al.*, 2008. En el mismo cuadro se incluyen con fines comparativos los porcentajes de aceite para todas las fracciones de harinas, obtenidos por el método soxhlet (método de referencia oficial). Los rendimientos grasos encontrados por ambos métodos de extracción son similares e incluso en algunos casos los rendimientos para la extracción en frío con éter dietílico es superior al obtenido por la extracción por soxhlet, lo que demuestra que el método de extracción aplicado resulta eficiente.

Efecto del secado de las distintas fracciones de harina sobre el rendimiento graso

El incremento en el tiempo de secado de las distintas harinas produjo en algunos casos un aumento en la eficiencia de la extracción con el solvente en frío (cuadro 2), por ejemplo la fracción B alcanza un rendimiento de mas del 17% con un tiempo de secado de 5 y 8 horas, lo que representa un aumento de 1,52% con respecto a las muestras que no fueron sometidas a ningún tiempo de secado. Los aumentos mas notables se produjeron en las fracciones C y D, alcanzándose 15,71 y 10,82%, lo que significa incrementos de 4,44 y 3,34%, respectivamente.

Effect of drying of different flour fractions on fat yield

The increase on drying time of different flours in some cases produced an increase on extraction efficiency with the cold solvent (table 2), for instance, B fraction reaches a yield of more than 17% with a drying time between 5 and 8 hours, that represent an increase of 1.52% respect to the samples subject to any drying time. The more notable increases were observed on C and D fractions, by reaching 15.71 and 10.82%, which means increases of 4.44 and 3.34%, respectively.

Physical and chemical composition of oil obtained in different flour fractions

Physical and chemical parameters

Values of physical and chemical parameters of oil from grape seeds, obtained from different flour fractions are shown in table 3. With comparative purposes, in the same table is included the interval of values reported by other authors for oils coming from other grape varieties (El-Zeany *et al.*, 1982; Turu Casao, 1983). With exception of refraction index showing values inferior, the rest of physical and chemical of parameters evaluated as a part of interval reported in literature for grape seeds oils.

Quality indexes

Results corresponding to the free acidity, expressed like oleic acid percentage, values of peroxide index (PI) and the oxidation state measured by the radiations absorptions in the ultraviolet, for grape seeds oils are shown in table 4. The acidity values

Cuadro 2. Efecto del secado de las fracciones de harina sobre el rendimiento graso (%).**Table 2. Effect of flour fractions drying on fatty yield (%).**

Fracción	Tiempo de secado a 60°C (h)	Rendimiento graso (%)
A	1	5,67±0,2
	2	5,59±0,2
	5	6,01±0,4
	8	5,93±0,3
B	1	14,13±0,7
	2	14,08±0,7
	5	17,65±1,2
	8	17,85±1,0
C	1	9,62±0,5
	2	9,67±0,4
	5	13,06±0,6
	8	15,71±1,1
D	1	6,45±0,4
	2	7,01±0,5
	5	7,03±0,6
	8	10,82±0,6
E	1	5,17±0,2
	2	9,76±0,6
	5	6,21±0,3
	8	6,71±0,3

Composición físico química del aceite obtenido en las distintas fracciones de harina**Parámetros físicos-químicos**

Los valores de los parámetros físicos-químicos del aceite de las semillas de uva, obtenido a partir de las distintas fracciones de harina se muestran en el cuadro 3. A efectos comparativos se incluye en el mismo cuadro el intervalo de valores señalados por otros autores para aceite de

in all the cases are under maximum limit permitted by Codex Alimentarius CODEX-STAN 210-19, (1981), which establishes for this oil type a maximum of 2%. In relation to the IP, data obtained they are between the intervals of 5 to 45 meq of O₂.kg⁻¹, reported in literature for grape seeds oils obtained with solvents (El-Zeany *et al.*, 1982; Galán *et al.*, 1986); therefore, they were inferior to those reported in the Codex

otras variedades de uva (El-Zeany *et al.*, 1982; Turu Casao, 1983). A excepción del índice de refracción que presentó valores inferiores, el resto de los parámetros físicos-químicos evaluados se encuentran dentro del intervalo señalado en la literatura para aceites de semillas de uva.

Índices de calidad

Los resultados correspondientes a la acidez libre, expresado como porcentaje de ácido oleico, valores de índice de peróxido (IP) y el estado de oxidación medido por la absorción de radiaciones en el ultravioleta, para los aceites de semillas de uva se muestran en el cuadro 4. Los valores de la acidez en todos los casos se encuentran por debajo del límite máximo permitido por el Codex Alimentarius CODEX-STAN 210-19, (1981), el cual establece para éste tipo de aceite un máximo de 2%. En cuanto al IP, los datos obtenidos se encuentran dentro de los intervalos de 5 a 45 meq de $O_2 \cdot kg^{-1}$, señalados en la literatura para aceites de semillas de uva, obtenidos con solventes (El-Zeany *et al.*, 1982; Galán *et al.*, 1986); así como también, muy inferior a lo que indica el Codex Alimentarius CODEX-STAN 210-19 (1981), como límite máximo permitido (15 meq de $O_2 \cdot kg^{-1}$) Por otro lado, los valores de absorción de radiaciones en el ultravioleta, indicadores de un estado oxidativo mas avanzado, lo que parece deberse a la evolución de los compuestos peroxidicos hacia otro tipo de sustancias mas oxidadas, responsables del mal olor y sabor de los aceites (Hermoso *et al.*, 1991), reflejaron bajas concentraciones de hidroperóxidos (K_{232}) o de productos secundarios de oxidación (K_{270}).

Alimentarius CODEX-STAN 210-19 (1981) as permitted limit (15 meq of $O_2 \cdot kg^{-1}$). On the other hand, the radiation absorption values in ultraviolet, indicators of an advanced oxidative stage that is probably caused by the peroxide compounds evolution toward other type of more oxidizes substances, responsible of bad smell and taste of oils (Hermoso *et al.*, 1991), which reflect low hydro peroxides concentrations (K_{232}) or oxidation secondary products (K_{270}).

Fatty acids composition of triacylglycerols

The profile of fatty acids of triacylglycerols was determined for oils coming from each flour fractions and results are shown in table 5. In general, results are in agreement with those reported in literature (Crews *et al.*, 2005; Parry *et al.*, 2005) respect to concentrations of saturate and insaturated fatty acids, where the linoleic acid is the main fatty acid with 65%, without significant differences between the different flour fractions studied. The concentrations of oleic acid that is a mono insaturated fatty acid with great importance from the nutritional point of view, were located in the interval between 20.67 and 21.79%, which is superior to those reported by Beveridge *et al.*, (2005) for varieties cultivated in Canada, but they agree with values reported by Crew *et al.* (2005) for "Cabernet" variety and those reported by Martinez *et al.* (1986) for "Palomino" variety (18.34 to 26.5%) from Spain origin too. There was any relationship in content of oleic or linoleic acid between different flour fractions which suggest a uniform distribution

Cuadro 3. Parámetros físicos-químicos de los aceites obtenidos de las distintas fracciones de las harinas de semillas de uva. (Determinaciones realizadas a 25°C).

Table 3. Oil physical and chemical parameters of obtained of different fractions of grape seeds flours. (Determinations made to 25°C).

	Fracciones de harinas						Referencias bibliográficas*
	A	B	C	D	E	F	
Índice de Refracción	1,4425	1,4533	1,4576	1,4531	1,4498	1,4498	1,4652 – 1,4790
Índice de Yodo(gI ₂ 100g)	97,37	97,35	97,57	100,27	100,50	100,37	96,44 – 140,70
Densidad (g cc ⁻¹)	0,9343	0,9279	0,9251	0,9316	0,9263	0,9322	0,91 – 0,93
Viscosidad (cP)	26,32	25,83	25,07	26,61	25,49	25,72	24,0 – 46,8

*El-Zeany *et al.* (1982); Turu Casao (1983)

Cuadro 4. Índices de calidad de los aceites obtenidos a partir de las distintas fracciones de harinas de semillas de uva.

Table 4. Oils quality indexes obtained from different fractions of grape seeds flour.

	Fracciones de harinas					
	A	B	C	D	E	F
Acidez libre (%)	1,20	1,27	1,32	1,60	1,71	1,52
I P (meq O ₂ .kg ⁻¹)	9,73	9,18	9,21	9,20	8,18	9,23
K ₂₃₂	2,0813	2,1207	2,1003	2,0012	2,2614	2,1684
K ₂₇₀	0,2931	0,3512	0,2936	0,3517	0,3049	0,3747

Composición en ácidos grasos de los triacilglicerol

El perfil de ácidos grasos de los triacilglicerol fue determinado para los aceites procedentes de cada una de las fracciones de harina y los resultados se muestran en el cuadro 5. En general, los resultados coinciden con los reportados en la literatura (Crew *et al.*, 2005; Parry *et al.*, 2005) en cuanto a las concentraciones de ácidos grasos saturados e insaturados, donde el ácido graso mayoritario es el linoleico con un 65%, sin diferencias significativas entre las distintas fracciones de harinas estudiadas. Las concentraciones de ácido oleico, que es un ácido graso monoinsaturado de gran importancia desde el punto de vista nutricional, se ubicaron en el intervalo entre 20,67 y 21,79%, que es mayor que lo señalado por Beveridge *et al.*, 2005, para variedades cultivadas en Canadá, pero que coinciden con los valores reportados por Crew *et al.*, 2005, para la variedad cabernet y con los señalados por Martínez *et al.*, 1986, para la variedad palomino (18,34 a 26,5%) también de origen es-

of these compounds in seeds. Nevertheless, the content of linoleic acid which is related to the prevention of coronary diseases, increase when diameter of flour particles is low, thus, biosynthesis of this compound, contrary to the previous fatty acids studied, is higher on the endosperm in comparison to the more external layers of seeds (Martinez *et al.*, 1986). In relation to the longer chain fatty acids like the arachidic, gadolenic and behenic only are detected in fractions C, D and E, possibly because the biosynthesis of oil production in seeds, that according to Horvath *et al.*, (2006) is show non the endosperm after it begin to migrate toward the more external layer of seeds, which would favor a richness in chain fatty acids superior to 18 carbons, such a way that in those cases where oil can be obtained with presence of long chain fatty acids, flours with a particle size inferior to 0.4mm diameter have to be used.

Composition of tocopherols and tocotrienols

The results of tocopherols and

Cuadro 5. Composición de ácidos grasos en los aceites obtenidos a partir de las distintas fracciones de harinas de semillas de uva.**Table 5. Fatty acids composition in oils obtained from different fractions of grape seeds flours.**

Ácido graso (%)	Fracciones de harinas					
	A	B	C	D	E	F
Mirístico	0,24 ^a	0,26 ^a	Nd	Nd	Nd	0,27 ^a
Palmítico	8,09 ^a	8,02 ^a	8,03 ^a	8,02 ^a	8,00 ^a	8,18 ^a
Estearico	4,65 ^b	4,45 ^b	4,40 ^b	4,45 ^b	4,47 ^b	4,54 ^b
Oleico	21,20 ^a	21,19 ^a	21,14 ^a	21,79 ^a	20,67 ^a	21,17 ^a
Linoleico	65,51 ^b	65,75 ^b	65,56 ^b	64,57 ^b	65,09 ^b	65,42 ^b
Linolénico	0,31 ^a	0,33 ^a	0,37 ^a	0,43 ^a	0,49 ^a	0,42 ^a
Araquídico	Nd	Nd	0,16 ^c	0,21 ^b	0,35 ^a	Nd
Gadolénico	Nd	Nd	0,11 ^c	0,26 ^b	0,39 ^a	Nd
Behénico	Nd	Nd	0,24 ^c	0,37 ^b	0,55 ^a	Nd
SFA	12,98	12,73	12,43	12,47	12,47	12,99
MUFA	21,20	21,19	21,14	21,79	20,67	21,17
PUFA	65,82	66,08	66,44	65,84	66,87	65,84

Promedios con la misma letra en cada fila no difieren significativamente (P<0,05)

Nd: No detectable (< 0,1%)

SFA: Ácidos grasos saturados.

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados.

PUFA: Ácidos grasos polinsaturados.

pañol. No se observó ninguna relación en el contenido de ácidos oleico o linoleico entre las distintas fracciones de harina, lo que sugiere una distribución uniforme de estos compuestos en las semillas. No obstante, el contenido de ácido linolénico, el cual ha sido relacionado con la prevención de enfermedades coronarias, aumenta en la medida que el diámetro de las partículas de harina es menor, por lo que la biosíntesis de este compuesto a diferencia de los ácidos grasos anteriores es mayor en el endospermo que en las capas mas externas de las semillas (Martínez *et al.*, 1986). En

tocotrienols composition present in oils are shown in table 6. With exception of β -tocotrienol that was undetected and δ -tocopherol, only found on in the complete fraction pf flour, the rest of tocochromanol isomers were present in oils obtained; however, with alpha predominance (α) and gamma (γ) tocotrienols, being the more notable the gamma (γ) tocotrienol in the intermediate fractions C and D. Beveridge *et al.* (2005), found maximum contents of γ tocotrienol between 217 and 350 mg.kg⁻¹ in oils of North America cultivars, with a percentage

cuanto a los ácidos grasos de cadena más larga como el araquídico, gadolénico y behénico solo se detectaron en las fracciones C, D y E, posiblemente debido a la biosíntesis de producción de aceite en las semillas, que según Horvath *et al.*, 2006, se inicia en el endospermo y luego comienza a migrar hacia las capas más externas de las semillas, lo que favorecería un enriquecimiento en ácidos grasos de cadena mayores a 18 carbonos, de manera que en los casos en los que se quiera obtener aceite con presencia de ácidos grasos de cadena larga se debe partir de harinas cuyo tamaño de partículas sea menor a 0,4mm de diámetro.

Composición en tocoferoles y tocotrienoles

En el cuadro 6, se presentan los resultados de la composición de tocoferoles y tocotrienoles presentes en los aceites. A excepción del β -tocotrienol que no fue detectado y el δ -tocopherol que solo se encontró en la harina fracción completa, el resto de los isómeros del tococromanol estuvieron presentes en los aceites obtenidos; sin embargo, con predominancia del alfa (α) y gamma (γ) tocotrienoles, siendo más notable el gamma (γ) tocotrienol en las fracciones intermedias C y D. Beveridge *et al.*, 2005, encontraron contenidos máximos de γ tocotrienol entre 217 y 350 mg.kg⁻¹ en aceites de cultivares de América del norte, con una distribución porcentual semejante a las obtenidas en el presente trabajo. Crews *et al.*, 2006, señalan concentraciones máximas de γ tocotrienol de 399 mg.kg⁻¹ para algunas variedades cultivadas en España. La literatura también señala con-

distribution similar to those obtained in this research. Crews *et al.*, (2006), establish maximum concentrations of γ tocotrienol of 399 mg.kg⁻¹ for some varieties cultivated in Spain. Literature also report total tocopherols in grape seeds oils in the interval of 328 to 578 mg.kg⁻¹ for varieties of grapes cultivated in Turquía (Gokturk and Ozkan, 2006; Gokturk and Akkurt, 2001), being α tocopherol the more abundant followed by the isomers gamma (γ) and delta (δ), whereas β tocopherol was not detected, as well as not the tocotrienols presence.

Composición en sterols

The results in relation to the phytosterols composition of oil obtained from different flour fractions are shown in table 7. Cholesterol presence was not detected at any samples as well as not significant differences in relation to the sterols contents for each of flour fractions analyzed. β -sitosterol has been the main sterol present in all the evaluated oils which agree with those reported by Beveridge *et al.* (2005) for the oil from other grape seeds varieties, and also those of Clifton *et al.* (2004) who reports the presence of different phytosterols in grape seeds oils, being detached as principals the β -sitosterol, campesterol and stigmasterol. In relation to the total contents of sterols, values are ranged between the intervals established by Crews *et al.* (2005) for grape seeds oils of different origin.

Conclusion

The results showed a higher

Cuadro 6. Composición en tocoferoles y tocotrienoles de los aceites obtenidos a partir de las distintas fracciones de harinas de semillas de uva (mg.kg⁻¹).

Table 6. Composition of tocopherols and tocotrienols of oils obtained from different fractions of grape seeds flour (mg.kg⁻¹).

Compuesto	Fracciones de harina					
	A	B	C	D	E	F
α-tocoferol	48,9 ^a	47,3 ^a	48,7 ^a	48,4 ^a	47,1 ^a	48,9 ^a
α-tocotrienol	205,2 ^a	213,1 ^a	205,6 ^a	202,7 ^a	210,3 ^a	207,1 ^a
β-tocoferol	37,1 ^a	25,2 ^a	34,1 ^a	27,5 ^a	32,7 ^a	25,7 ^a
γ-tocoferol	16,8 ^b	20,4 ^b	19,3 ^b	20,7 ^b	18,6 ^b	17,2 ^b
γ-tocotrienol	256,6 ^a	272,3 ^a	326,0 ^b	395,8 ^c	269,7 ^a	261,1 ^a
δ-tocoferol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	2,1
δ-tocotrienol	10,2 ^b	10,6 ^b	12,5 ^b	11,3 ^b	10,9 ^b	14,3 ^b
Tocoferoles totales	576,8	588,9	656,2	706,4	589,3	576,4

Promedios con la misma letra en cada fila no difieren significativamente (P<0,05)
Nd: No detectable (<0,1%)

centraciones de tocoferoles totales en aceites de semillas de uva en el intervalo de 328 a 578 mg.kg⁻¹ para variedades de uvas cultivadas en Turquía (Gokturk y Ozkan, 2006; Gokturk y Akkurt, 2001), siendo el α tocoferol el mas abundante seguidos por los isómeros gamma (γ) y delta (δ), mientras que el β tocoferol no fue detectado, así como tampoco la presencia de tocotrienoles.

Composición en esteroides

En el cuadro 7, se presentan los resultados en cuanto a la composición de fitoesteroides de los aceites obtenidos a partir de las distintas fracciones de harina. No se detectó en ninguna de las muestras presencia del colesterol, así como tampoco diferencias significativas en cuanto a los contenidos de esteroides para cada una de las fracciones de harinas analizadas.

fatty yield after seeds were treated with milling, sieved and dried. Oils analyzed shows a profile in fatty acids with predominance of linoleic acid, a fatty acid essential for human diet because it is synthesized in cells have to be consumed on feeding by its importance like structures constituent and cellular membranes. Presence of α and γ tocotrienols together with the absence of cholesterol offer to this oil good anti oxidant properties and excellent qualities like anti cholesterolemic agent.

End of english version

El βsitosterol ha sido el esteroide mayoritario presentes en todos los aceites evaluados, lo cual coincide con lo señalado por Beveridge *et al.*, 2005, para

Cuadro 7. Composición en esteroides de los aceites obtenidos a partir de las distintas fracciones de harinas de semillas de uva (%).

Table 7. Sterols composition of oil obtained from different fractions of grape seeds flour (%).

Compuesto	Fracciones de harina					
	A	B	C	D	E	F
Colesterol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Brassicasterol	0,89 ^c	0,88 ^c	0,84 ^c	0,91 ^c	0,79 ^c	0,90 ^c
Campesterol	6,18 ^b	6,07 ^b	6,31 ^b	6,0 ^b	5,98 ^b	6,22 ^b
Campestanol	0,73 ^c	0,76 ^c	Nd	Nd	Nd	Nd
Estigmasterol	10,57 ^b	10,28 ^b	10,61 ^b	10,55 ^b	10,70 ^b	10,60 ^b
Clerosterol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ásitosterol	63,82 ^a	63,69 ^a	62,95 ^a	63,86 ^a	63,65 ^a	63,57 ^a
Sitostanol	6,72 ^b	7,02 ^b	6,85 ^b	6,73 ^b	6,51 ^b	6,73 ^b
Δ-5-avenosterol	2,70 ^a	2,70 ^a	2,72 ^a	2,71 ^a	2,70 ^a	2,91 ^a
Δ-5-24-estigmastodiolenol	2,42 ^a	2,58 ^a	2,95 ^a	2,97 ^a	2,99 ^a	2,59 ^a
Δ-7-estigmastenol	4,57 ^a	4,61 ^a	4,63 ^a	4,62 ^a	4,63 ^a	4,63 ^a
Δ-7-avenosterol	1,40 ^c	1,41 ^c	1,42 ^c	1,65 ^c	1,40 ^c	1,85 ^c
Total (mg.kg ⁻¹)	3.509	3.581	3.617	3.632	3.510	3.490

Promedios con la misma letra en cada fila no difieren significativamente (P<0,05)

Nd: No detectable (<0,1%)

el aceite de otras variedades de semillas de uva, así como también con los resultados de Clifton *et al.*, 2004, que señalan la presencia de diversos fitoesteroles en aceites de semillas de uva, destacándose como mayoritarios el β sitosterol, campesterol y estigmasterol. En cuanto a los contenidos totales de esteroides, los valores se encuentran dentro del intervalo establecido por Crews *et al.*, 2005, para aceites de semillas de uva de distintas procedencia.

Conclusión

Los resultados mostraron un rendimiento graso mas elevado luego de que las semillas fueron sometidas a tratamientos de molienda, tamizado y secado. Los aceites analizados presentan un perfil en ácidos grasos con predominancia del ácido linoleico, un ácido graso esencial para la dieta humana, ya que no se sintetiza en las células y debe ser ingerido en la alimentación por su importancia como constituyente de estructuras y membranas celulares. La presencia del α y γ tocotrienoles, unido a la ausencia de colesterol le confiere a éste aceite buenas propiedades antioxidantes y excelentes cualidades como agente anticolesterolémico.

Literatura citada

- AOAC. 1990. Official Methods of the Analysis of the Association of Official. Analytical Chemist. 15th Ed V Arlington, U.S.A.
- AOCS. 1998. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, Official methods and Recommended Practices. 5th Ed.
- AOCS Press. Champaign Illinois, U.S.A.
- Beveridge, T.H.J., B. Girard, T. Kopp and C.G. Drover. 2005. Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether, varietal effects. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1799-1804.
- CODEX STAN 210 19. 1981. (Rev. 2-1999). Norma del Codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. P 1-5.
- Commision of the European Communitis. 1991. Regulation CEE/2568/1991. Official Journal of European Communities, N° L. 248/9
- Commision of the European Communitis. 2002. Regulation UE/796/2002. Official Journal of European Communities, N° L. 128/8
- Clifton, P., M. Roakes, D. Ross, A. Fassoulakis, M. Cehun and P. Nestel. 2004. High dietary intake of phytosterol esters decreases carotenoids and increases plasma plant sterol levels with no additional cholesterol lowering. *Journal of Lipid Research* 45:1493-1499.
- Crews, C., P. Hough, J. Godward, P. Brereton., M. Lees, S. Guiet and W. Winkelman. 2005. A study of the main constituents of some authentic gregeseed oils. *J. Agric. Food Chem.* 53:4853-4860.
- Crews, C., P. Hough, J. Godward, P. Brereton., M. Lees, S. Guiet and W. Winkelman. 2006. Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6261-6265.
- El-Zeany, B.A., M. Abdel Kawny and M.M. Amer. 1982. Egyptian grape seed oil. Part I: extraction, constants, fatty acids and unsaponifiables. *Aceites y Grasas.* 32:158-161.
- Galán, M., G. M. Martínez, J. A. Montiel, E. Pando y F. Rodríguez. 1986.

- Estudio de subproductos agrícolas. Aceites de pepitas de uva palomino, extracción, constantes y ácidos grasos. *Grasas y Aceites* 37(4):179-182.
- Gokturk B. y G. Ozkan. 2006. Tocopherol contents of some Turkish wine by-products. *European Food Research and Technology*. 23(2):290-293.
- Gokturk B. y M. Akkurt. 2001. Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds. *Turk. J Agric. For.* 25:163-168.
- Hermoso, M., M. Uceda, A. García-Ortiz, J. Morales, L. Frías y A. Fernández. 1991. Elaboración de aceite de oliva de calidad. Dirección General de Investigación. Tecnología y Formación Agroalimentaria y Pesquera, Sevilla. Servicio de Publicaciones y Divulgación. D.L.
- Horvath, G., L. Wessjonen, J. Bigirimana, H. Monica., M. Jansen, Y. Guizes, R. Caubergs and N. Horemans. 2006. Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis Vinifera* L. cv. Albert Lavallé) *Plant Phys. and Biochem.* 44: 724-731.
- Martínez, M. G., J. A. Montiel, E. Pando, y F. Rodríguez. 1986. Estudio de subproductos agrícolas. II Composición de ácidos grasos de semilla de uva palomino. *Grasas y Aceites*. 37(5): 233-236.
- Matthäus, B. 2008. Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *Eur. J. Lipid Sci. technol.* 110, 645-650.
- Norma Española UNE 55-030. 2002. Cuerpos Grasos. Determinación del contenido en materia grasa total de la aceituna. AENOR.
- Parry, J., L. Su, M. Luther, K. Zhou, M. Peter, P. Whittaker, and L. Yu. 2005. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry and blueberry seed oils. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 566-573.
- Turu Casao, H. 1983. Aceite de pepita de uva. Presente, pasado y futuro. *Alimentaria* 141, 17-31.