

## Caracterización del aceite y harina obtenido de la semilla de uva silvestre (*Vitis tiliifolia*)\*

### Characterization of oil and meal obtained from wild grape seeds (*Vitis tiliifolia*)

Nadia Juárez Trujillo<sup>1</sup>, Víctor Manuel Jiménez Fernández<sup>2</sup>, José Antonio Guerrero Analco<sup>3</sup>, Juan Luis Monribot Villanueva<sup>3</sup> y Maribel Jiménez Fernández<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Básicas-Universidad Veracruzana. Av. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n. Col. Industrial-Animas, Xalapa, Veracruz, México. CP. 91000. Tel. 01 (228) 8418900, Fax: 01 (228) 8418932. <sup>2</sup>Facultad de Instrumentación Electrónica-Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México. <sup>3</sup>Red de estudios Moleculares Avanzados, Clúster Biomimic<sup>®</sup>, Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: maribjimenez@uv.mx.

#### Resumen

*Vitis tiliifolia* es una uva silvestre que se consume generalmente en forma de vino, pero las semillas son desechadas, por lo que en este trabajo las propiedades fisicoquímicas de la harina y el aceite de las semillas de uvas de *Vitis tiliifolia* fueron evaluadas, se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos mediante UPLC-ESI-MS. La harina de la semilla tuvo 75% de humedad, 0.23% de proteínas, 1.43% de cenizas, 3.15% de fibra total dietaria y 17.5% de aceite. La caracterización de polifenoles en la harina reveló la presencia de (-)-epicatequina (1318.66  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), (+)-catequina (703.12  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) y trans-resveratrol (32.88  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) como los polifenoles mayoritarios. El aceite presentó compuestos bioactivos como carotenoides y polifenoles. Los ácidos grasos que predominaron en el aceite fueron el ácido linoleico ( $\Omega$ -6, 84.73%), oleico ( $\Omega$ -9, 5.83%) y esteárico (2.21%) Adicionalmente los extractos, etanol: agua (3:1; v: v) y metanol: HCl (0.01%) del aceite, resultaron tener una alta concentración de polifenoles (125 mg GAE  $\text{g}^{-1}$ ) y una alta actividad antioxidante. El índice de yodo fue de 68.56 g I<sub>2</sub>/100 g aceite y el índice de peróxidos fue de 20 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> aceite. Las semillas tuvieron una

#### Abstract

*Vitis tiliifolia* is a wild grape that is usually consumed as wine, but the seeds are discarded, so in this paper the physicochemical properties of flour and oil of grapes seeds *Vitis tiliifolia* were evaluated, the phenolic compounds were identified and quantified by UPLC-ESI-MS. Seed meal had 75% moisture, 0.23% protein, 1.43% ash, 3.15% total dietary fiber and 17.5% oil. The characterization of polyphenols in flour revealed the presence of (-)-epicatechin (1318.66  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), (+)-catechin (703.12  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and trans-resveratrol (32.88  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) as the major polyphenols. The oil featured bioactive compounds such as carotenoids and polyphenols. The fatty acids that predominated in the oil were linoleic ( $\Omega$ -6, 84.73%), oleic ( $\Omega$ -9, 5.83%) and stearic acid (2.21%). In addition the extracts, ethanol: water (3:1; v: v) and methanol: HCl (0.01%) of the oil, resulted in a high concentration of polyphenols (125 mg GAE  $\text{g}^{-1}$ ) and a high antioxidant activity. The iodine value was 68.56 g I<sub>2</sub>/100 g oil and the peroxide was 20.0 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> oil. The seeds had a considerable amount of polyphenols and linoleic acid that confers a high antioxidant activity, so it could be suitable for use in food and industrial applications and encourage

cantidad considerable de polifenoles y ácido linoleico que le confieren una alta actividad antioxidante, por lo cual podría ser adecuada para su uso en aplicaciones alimentarias e industriales y fomentar la producción y consumo de esta uva como fuente de nutrientes y compuestos fenólicos adecuados para su incorporación en alimentos funcionales.

**Palabras claves:** ácidos grasos, polifenoles y actividad antioxidante, uva silvestre.

## Introducción

*Vitis tiliifolia* es una uva silvestre que aún no ha sido reconocida adecuadamente por investigadores y enólogos. Es un arbusto que puede ser pequeño a muy grande, con tallos leñosos que pueden medir entre 10 y 35 m de largo y hasta 20 cm de diámetro. Crece comúnmente en bosques húmedos, secos y matorrales, encontrándose a menudo en los bosques de pinos y encinos, aunque es más abundante en elevaciones bajas. Su presencia se extiende a 1 700 msnm. Esta uva es originaria de los estados del sur de México y crece en un rango desde las Antillas hasta Colombia (Fernández, 2009). En México, crece en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz, donde es conocida por diferentes nombres de acuerdo a donde crece, tales como uva de montaña, liana cazadora de agua, broncadora, conduj, Gunhi, loobabi-chuli, sanalo todo, tecamate, xocomecatli, y otros más (Arellano *et al.*, 2003). *Vitis tiliifolia* florea de mayo a junio y fructifica de agosto a noviembre (Ibarra-Manríquez and Sinaca, 1996). Sus frutos han sido utilizados como materias primas para elaborar jugos y vinos artesanales (Lascurain *et al.*, 2010). Las uvas frescas se utilizan para hacer vinagre y bebidas no alcohólicas (Fernández, 2009), mientras que la raíz y las hojas se utilizan empíricamente contra las hemorroides. La uva contiene una sola semilla que puede ser considerada como una fuente no convencional de lípidos; pero hasta el momento esta semilla no ha sido explotada.

Las semillas de la uva usualmente son desechadas como parte del proceso de elaboración del vino; Sin embargo, la extracción y la venta de aceite de semillas de uva y extracto de semillas de uva puede ser un negocio rentable, así como un uso eficiente de los subproductos. El aceite de semilla de uva de otras variedades es conocido por los beneficios de su valor nutricional, debido a su alto contenido de ácido

the production and consumption of this grape as a source of nutrients and phenolic compounds suitable for incorporation into functional foods.

**Keywords:** fatty acids, polyphenols and antioxidant activity, wild grape.

## Introduction

*Vitis tiliifolia* is a wild grape that has not yet been adequately recognized by researchers and oenologists. It is a shrub that can be small to very large, with woody stems that can measure between 10 and 35 m long and up to 20 cm in diameter. It grows commonly in humid, dry forests and thickets, it is often found in pine and oak forests, although it is more abundant at low elevations. Its presence extends to 1 700 msnm. This grape is native to the southern states of México and grows in a range from the Antilles to Colombia (Fernández, 2009). In México, it grows in the states of Chiapas, Colima, Guerrero, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz where it is known by different names according to where it grows, such as mountain grape, water hunter liana, broncadora, conduj, Gunhi, loobabi-chuli, sanalo todo, tecamate, xocomecatli, and others (Arellano *et al.*, 2003). *Vitis tiliifolia* flowers from May to June and bears fruit from August to November (Ibarra-Manríquez and Sinaca, 1996). Its fruits have been used as raw materials to produce juices and handcrafted wines (Lascurain *et al.*, 2010). Fresh grapes are used to make vinegar and non-alcoholic beverages (Fernández, 2009), while the roots and leaves are used empirically against hemorrhoids. The grape contains a single seed that can be considered as an unconventional source of lipids; but so far this seed has not been exploited.

Grape seeds are usually discarded as part of the winemaking process; however, extracting and selling grape seed oil and grape seed extract can be a profitable business as well as an efficient use of byproducts. Grape seed oil of other varieties is known for the benefits of its nutritional value due to its high linoleic acid content (about 72-76%), this is commonly used for frying foods (due to its high smoke point) or is included in dressings and sauces. It is also used in cosmetics because of its moisturizing skin characteristics (Da Porto *et al.*, 2013). Grape seeds are a rich source of monomeric phenolic compounds such as

linoleico (aproximadamente 72-76%), este se utiliza comúnmente para freír alimentos (debido a su alto punto de humo) o se incluye en aderezos y salsas. También se utiliza en cosméticos debido a sus propiedades humectantes de la piel (Da Porto *et al.*, 2013). Las semillas de uva son una fuente rica de compuestos fenólicos monoméricos tales como (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-O-gallate y dímeros, trímeros y tetrameros de procianidinas (Saito *et al.*, 1998). Además, el aceite y la harina de uva contienen polifenoles y otros compuestos bioactivos que son atractivos para la industria debido a sus propiedades antioxidantes (Crews *et al.*, 2006). Estos compuestos son de gran interés para las industrias farmacéutica y de alimentos ya que poseen propiedades anti-envejecimiento, anti-inflamatoria, anti-carcinogénica, anti-mutagénica, anti-ulceras y efectos anti-virales, además de estar asociados con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Da Porto *et al.*, 2013).

Sin embargo, por lo que sabemos no existe información relativa a las propiedades fisicoquímicas y la composición del aceite de la semilla de *Vitis tiliifolia*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la composición, propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del aceite y la harina obtenida de la semilla de *Vitis tiliifolia*. Esta información es esencial para una evaluación completa del uso del aceite en posibles aplicaciones industriales.

## Materiales y métodos

### Reactivos

2,2'-difencil-1-picrilhidrazil (DPPH), Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico), reactivo de Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tris (2 piridil) -1, 3,5-triazina (TPTZ), ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, (+)-catequina, ácido vainillico, ácido clorogénico, ácido cafeico, (-)-epicatequina, vainillina, ácido-4-cumarico, quercetina-3-glucosido, quercetina, rutina, ácido ferulico, ácido *trans*-cinámico, mangiferina, umbeliferona, quercetina 3,4-di-O-glucosido, escopoletina, ácido ferúlico, quercetina-3-D-glucosido, luteolina 7-O-glucosido, kaempferol 3-O-glucosido, ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico, cirsimarina, luteolina, angelicina, apigenina, kaempferide, piperina y ácido dehidroabietico fueron comprados a Extrasynthese (Lyon, France), y a Sigma-Aldrich (USA).

(+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-O-gallate and dimers, trimers and tetramers of procyanidins (Saito *et al.*, 1998). Also, grape oil and meal contain polyphenols and other bioactive compounds which are attractive to the industry due to its antioxidant properties (Crews *et al.*, 2006). These compounds are of great interest to the pharmaceutical and food industries as it possess anti-aging, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-mutagenic, anti-ulcer and anti-viral effects, besides being associated with a lower risk cardiovascular disease (Da Porto *et al.*, 2013).

However, to our knowledge there is no information on the physicochemical properties and composition of seed oil from *Vitis tiliifolia*. Therefore, the objective of this study was to evaluate the composition and physicochemical properties antioxidants oil and flour obtained from the seed of *Vitis tiliifolia*. This information is essential for a comprehensive assessment of the use of oil in possible industrial applications.

## Materials and methods

### Reagents

2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Folin-Ciocalteu reagent, 2,4,6- 2 - pyridyl) -1, 3,5-triazine (TPTZ), gallic acid, 4-hydroxybenzoic acid, (+)-catechin, vanillic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, (-)-epicatechin, vanillin, acid-4- coumaric, quercetin-3-glucoside, quercetin, rutin, ferulic acid, *trans*-cinnamic acid, mangiferin, umbelliferone, quercetin 3,4-di-O-glucoside, scopoletin, ferulic acid, quercetin-3-D-glucoside, luteolin 7-O-glucoside, kaempferol 3-O-glucoside, 2,4-dimethoxy-6-methylbenzoic acid, cirsimarine, luteolin, angelicin, apigenin, kaempferide, piperine and dehydroabietic acid were purchased from Extrasynthese (Lyon, France) and Sigma- Aldrich (USA). The solvents used for extraction were analytical grade and those used for Ultra High Resolution Liquid Chromatography (UPLC) processes were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Reference solutions, samples, solvents and reagents were filtered through a PTFE 0.20 µm membrane filter (Phenomenex, USA) prior to separation or injection into the equipment.

Los solventes utilizados para la extracción fueron grado analítico y los utilizados para los procesos de Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UPLC) fueron comprados a Sigma-Aldrich (USA). Las soluciones de referencia, muestras, solventes y reactivos fueron filtrados a través de un filtro de membrana PTFE 0.20  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA) antes de la separación o inyección en el equipo.

### Obtención de las muestras

Las muestras de *Vitis tiliifolia* fueron recolectadas del rancho el “Cafetal”, localizado en el estado de Veracruz, México. Situado en las coordenadas 19° 37' 0.4" latitud norte y 96° 50' 2.7" longitud oeste, a una altitud de 734 m. Las variedades de uva fueron recolectadas en estado óptimo de maduración, con sólidos solubles fueron entre 12–14 °brix. Las semillas fueron obtenidas por separación manual a partir de 5 kg de muestra, fueron lavadas varias veces con agua, secadas en estufa de vacío (Shel Lab, USA) a 50 °C, posteriormente se pasaron a través de un molino (Glen Mills, USA) varias veces hasta obtener un menor tamaño de 0.5 mm. La muestra fue dividida en porciones de 100 g, colocadas en bolsas a vacío, congeladas a -40 °C y protegidas de la luz para su posterior análisis.

### Determinación de propiedades fisicoquímicas de la harina

El contenido de nitrógeno total fue determinado por el método micro-Kjendahl y la proteína fue calculada utilizando el factor de 6.25, el contenido de cenizas fue determinado pesando el producto incinerado en una mufla a 550 °C. La acidez total titulable, azúcares reductores y la concentración de fibra total dietaria fueron determinados de acuerdo a la metodología descrita en el AOAC (2000). El aceite fue extraído de la harina seca utilizando un equipo Soxhlet y hexano (60-80 °C) durante 6 h. Los extractos fueron filtrados y concentrados a vacío para obtener los extractos crudos los cuales fueron almacenados en un desecador hasta que fueron utilizados.

### Determinación de parámetros fisicoquímicos de aceite

El índice de peróxido, porcentaje de acidez, índice de yodo, materia saponificable e insaponificable fueron evaluados de acuerdo con los Métodos Oficiales y Prácticas Recomendadas de la AOCS (1998). El índice de refracción

### Collection of samples

*Vitis tiliifolia* samples were collected from the “Cafetal” ranch, located in the state of Veracruz, México. Located at coordinates 19° 37' 0.4" north latitude and 96° 50' 2.7" west longitude, at an elevation of 734 masl. The grape varieties were harvested at optimum ripening stage, with soluble solids ranging between 12-14 brix. The seeds were obtained by manual separation from 5 kg of sample, washed several times with water, dried in a vacuum oven (Shel Lab, USA) at 50 °C, then passed through a mill (Glen Mills, USA) several times until obtaining a smaller size of 0.5 mm. The sample was divided into 100 g portions, placed in vacuum bags, frozen at -40 °C and protected from light for further analysis.

### Determination of physicochemical properties of flour

The total nitrogen content was determined by the micro-Kjendahl method and the protein was calculated using the factor of 6.25, the ash content was determined by weighing the product incinerated in a muffle at 550 °C. Titratable total acidity, reducing sugars and total dietary fiber concentration were determined according to the methodology described in AOAC (2000). The oil was extracted from the dry flour using Soxhlet and hexane (60-80 °C) for 6 h. The extracts were filtered and concentrated in vacuo to obtain the crude extracts which were stored in a desiccator until they were used.

### Determination of physicochemical parameters of oil

The peroxide index, acidity percentage, iodine number, saponifiable matter and unsaponifiable matter were evaluated according to the Official and Recommended Methods of AOCS (1998). The refractive index was determined with an Abbe refractometer at 40 °C and the viscosity was measured with an Anton Paar viscometer at 25 °C. The titratable acidity was determined by titration of an oil solution dissolved in an ethanol: ether mixture (1:1, v: v) with a solution of 0.1 M potassium hydroxide in ethanol. Spectroscopic indices,  $K_{232}$ ,  $K_{268}$ , in the UV region were determined with a UV/Vis spectrophotometer (JENWAY, Model 6305, Japan), in the oil diluted with isooctane [10]. Determining the fatty acid profile of oil of *Vitis tiliifolia* was performed according to the method described by Lopez *et al.* (2001).

fue determinado con un refractómetro Abbe a 40 °C y la viscosidad fue medida con un viscosímetro Anton Paar a 25 °C. La acidez titulable, fue determinada por titulación de una solución de aceite disuelto en una mezcla de etanol: eter (1:1, v: v) con una solución de hidróxido de potasio 0.1 M en etanol. Los índices espectroscópicos,  $K_{232}$ ,  $K_{268}$ , en la región UV, fueron determinados con un espectrofotómetro UV/Vis (JENWAY, modelo 6305, Japon), en el aceite diluido con iso octano [10]. La determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de *Vitis tiliifolia* fue realizado de acuerdo al método descrito por López *et al.* (2001).

### **Análisis de actividad antioxidante**

La actividad antioxidante fue analizada en los extractos metanol:agua (3:1; v: v) y metanol:0.1% HCl (v: v) obtenidos a partir de la harina. Alícuotas de 5 g de las muestras pulverizadas (harina) se pesaron en matraces Erlenmeyer y se extrajeron con 100 mL de los disolventes antes mencionados durante 24 h con agitación. Posteriormente se lavaron con nitrógeno con la finalidad de evitar la oxidación. Los extractos se centrifugaron (10 min, 5 366 g) y los sólidos se volvieron a extraer con 100 mL de los respectivos disolventes durante 60 min. Por último, los extractos se combinaron y se filtraron a vacío a través de filtros Whatman núm. 1, y a continuación se concentraron en un rotaevaporador a 35 °C (R-210; Büchi, Flawil, Suiza).

### **Contenido de fenoles totales**

El contenido total de fenoles totales fue determinado usando el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Los extractos de uva fueron mezclados con reactivo de Folin-Ciocalteu y posteriormente se agregó solución de carbonato de sodio (10%). La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente en oscuridad durante 120 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm. El resultado se comparó con una curva de calibración ( $R^2= 0.89$ ) obtenida con un rango similar de concentraciones de ácido gálico, y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extracto.

### **Capacidad de captura de radical libre DPPH**

La capacidad de captación de radicales libres DPPH se estimó mediante el método de Brand-Williams *et al.* (1995). Los extractos previamente obtenidos de las semillas se mezclaron con solución metanólica de DPPH y se mantuvieron en

### **Analysis of antioxidant activity**

The antioxidant activity was analyzed in the extracts methanol: water (3:1; v: v) and methanol: 0.1% HCl (v: v) obtained from the flour. 5 g aliquots of the pulverized samples (flour) were weighed in Erlenmeyer flasks and extracted with 100 mL of the aforementioned solvents for 24 h with shaking. Subsequently they were washed with nitrogen in order to avoid oxidation. The extracts were centrifuged (10 min, 5 366 g) and the solids were re-extracted with 100 mL of respective solvents for 60 min. Finally, the extracts were combined and vacuum filtered through Whatman num. 1 filters, and then concentrated in a rotavaporator at 35 °C (R-210; Büchi, Flawil, Switzerland).

### **Total phenol content**

The total content of total phenols was determined using the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965). The grape extracts were mixed with Folin-Ciocalteu reagent and subsequently a sodium carbonate solution (10%) was added. The mixture was reacted at room temperature in the dark for 120 minutes, then the absorbance at 765 nm was measured. The result was compared with a calibration curve ( $R^2= 0.89$ ) obtained with a similar range of concentrations of gallic acid, and expressed as mg gallic acid equivalents (EAG) per g of extract.

### **DPPH free radical capture capability**

The ability of DPPH free radical capture was estimated by the method of Brand-Williams *et al.* (1995). The extracts previously obtained from the seeds were mixed with DPPH methanolic solution and kept in the dark for 30 min. The absorbance of the reaction mixture was measured at 517 nm on a UV/VIS spectrophotometer (Jenway, model 6305, Japan).

### **Antioxidant activity (%) expressed in oxidation percentage of $\beta$ -carotene/linoleic**

The antioxidant activity was evaluated through of  $\beta$ -carotene bleaching according to reports from Oboh *et al.* (2009). The absorbance of the samples and control were measured at 470 nm using a UV/Vis spectrophotometer (JENWAY, Model 6305, Japan) against a blank consisting of  $\beta$ -free carotene emulsion.

oscuridad durante 30 min. La absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 517 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Jenway, modelo 6305, Japón).

### **Actividad antioxidante (%) expresada en porcentaje de oxidación de $\beta$ -caroteno/linoleico**

La actividad antioxidante fue evaluada a través del blanqueo de  $\beta$ -caroteno de acuerdo a lo reportado por Oboh *et al.* (2009). La absorbancia de las muestras y el control se midieron a 470 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (JENWAY, modelo 6305, Japón) contra una blanco que consiste en emulsión de  $\beta$ -caroteno libre.

### **Poder reductor**

El poder reductor se determinó de acuerdo al método de Yen y Duh (1993). Una alícuota de 0.125 mL de la muestra a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> se colocó en un tubo de ensayo y se añadieron 1.25 mL de búfer de fosfatos (200 mM, pH 6.6) y 1.25 mL de ferrocianuro de potasio (1%). La mezcla fue incubada a 50 °C durante 20 min. Después, se añadieron 1.25 mL de ácido tricloroacético al 10%, la cual se centrifugó a 650 x g durante 10 minutos. Una alícuota de 2.5 mL del sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 2.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de cloruro férrico. La densidad óptica se midió a 700 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Jenway, modelo 6305, Japón).

### **Identificación y contenido de polifenoles en la harina de semilla de uva**

Para el análisis fitoquímico, los extractos fueron preparados utilizando un sistema de extracción acelerada por disolventes (ASE 350, Thermo Scientific, EE.UU.), 3.0 g de material seco se dispersaron en 1 g de tierra de diatomeas y colocado en una celda de 34 mL. La celda se llenó con metanol hasta una presión de 1 500 psi y se calentó a 60 °C durante 5 min después las celdas se lavaron con 30% del volumen de la misma. El extracto se concentró con un rotaevaporador (Büchi RII, Suiza). 10 mg de extracto crudo se redisolvió en 1 mL de MeOH con 0.1% de ácido fórmico (grado MS, Sigma-Aldrich), se filtraron y se colocaron en un vial de 1.5 mL. La muestra se analizó por triplicado. La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales, fue establecida por cromatografía de ultra alta resolución (UPLC) (Agilent serie 1290) y monitoreo dinámico multiple reacción de (dMRM) siguiendo las condiciones del protocolo de Durand-Hulak *et al.* (2015).

### **Reducing power**

Reducing power was determined according to the method of Yen and Duh (1993). A 0.125 mL aliquot of the sample at a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> was placed in a test tube and 1.25 mL of phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 1.25 mL of potassium ferrocyanide (1%) were added. The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Then, 1.25 mL of 10% trichloroacetic acid were added, and then centrifuged at 650xg for 10 minutes. A 2.5 mL aliquot of the supernatant was transferred to a new tube and 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of ferric chloride were added. The optical density was measured at 700 nm on a UV/VIS spectrophotometer (Jenway, model 6305, Japan).

### **Identification and content of polyphenols in grape seed meal**

For phytochemical analysis, the extracts were prepared using a solvent-accelerated extraction system (ASE 350, Thermo Scientific, USA), 3.0 g of dry material were dispersed in 1 g of diatomaceous soil and placed in a 34 mL cell. The cell was filled with methanol to a pressure of 1500 psi and heated at 60 °C for 5 min then the cells were washed with 30% of that volume. The extract was concentrated with a rotary evaporator (Büchi RII, Switzerland). 10 mg of crude extract were redissolved in 1 mL MeOH with 0.1% formic acid (MS grade, Sigma-Aldrich), filtered and placed in a 1.5 mL vial. The sample was analyzed in triplicate. The identification and quantification of individual phenolic compounds was established by ultra high resolution chromatography (UPLC) (Agilent series 1290) and multiple dynamic reaction monitoring (dMRM) following the conditions of protocol-Hullack Durand *et al.* (2015).

### **Statistic analysis**

Data were subjected to Anova and Tukey test (Statistica 7.0 software) and considered as significant a value of  $p < 0.05$ . All assays were performed in triplicate (n= 3).

## **Results and discussion**

### **Characterization of meal obtained from seeds of *Vitis tiliifolia***

Some physicochemical parameters of the seed of *Vitis tiliifolia* grape are described in Table 1. Seeds of *Vitis tiliifolia* are round, have an average length of 3.81 mm and a width of

## Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a Anova y prueba de Tukey (software Statistica 7.0) y consideraron significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los ensayos se realizaron por triplicado ( $n = 3$ ).

## Resultados y discusión

### Caracterización de harina obtenida de semillas de *Vitis tiliifolia*

Algunos parámetros físico-químicos de la semilla de la uva *Vitis tiliifolia* se describen en el Cuadro 1. Las semillas de *Vitis tiliifolia* son redondas, tienen una longitud promedio de 3.81 mm y una anchura de 3.03 mm. Su peso promedio es de 0.15 g, con un contenido de humedad de 75%. El porcentaje de acidez total titulable (3.02%) es inferior a lo reportado para otras variedades de uvas (Jiang-Fei *et al.*, 2012). Esta semilla tiene una menor cantidad de fibra dietética total (4.15%) que lo reportado para otras variedades de semilla de uva (Bravo y Saura-Calixto, 1998) y el contenido en aceite de las semillas de la uva fue 17.5%, lo que está en el rango de 9.9 a 20% reportado para otras variedades de uva (Bravo y Saura-Calixto, 1998; Ohnishi *et al.*, 1990).

### Análisis de compuestos químicos presentes en la harina de la semilla

Con el fin de obtener los compuestos que contribuyen de la alta actividad antioxidante, fueron identificados y cuantificados los polifenoles presentes en la harina de semilla (Cuadro 2). Se aislaron siete compuestos, y sus estructuras químicas se identificaron con las bases de los datos espectrales de cromatografía de ultra alta resolución- espectrometría de masas (UHPLC-MS). Se usó un protocolo de espectrometría de masas en modo de operación de monitoreo de reacciones múltiples (del inglés, MRM, MS), en un rango de tiempos de retención de 1.5 a 46 min, energía de colisión entre 10 y 30, con valores de  $R^2 > 0.971$  de linealidad en el rango de concentración de 0.1 a 14 mM. Del extracto metanólico, los dos compuestos principales fueron: (-)-epicatequina (1 318.66  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) y (+)-catequina (703.12  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), seguido de trans-resveratrol (32.88  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), quercetina-3-glucósido (14.65  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), ácido gálico (3.32  $\pm$  0.49  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), quercetina-3-D-galactósido (1.38  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) y por último vainillina (0.83  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), todos ellos contribuyen a la actividad antioxidante en otros tipos de uvas (Maier *et al.*, 2009).

3.03 mm. Its average weight is 0.15 g, with a moisture content of 75%. The percent of total titratable acidity (3.02%) is less than that reported for other varieties of grapes (Jiang-Fei *et al.*, 2012). This seed has a smaller amount of total dietary fiber (4.15%) than that reported for other grape seed varieties (Bravo and Saura-Calixto, 1998) and the oil content of the grape seeds was 17.5%, which is in the range of 9.9 to 20% reported for other grape varieties (Bravo and Saura-Calixto, 1998; Ohnishi *et al.*, 1990).

### Cuadro 1. Análisis fisicoquímico y proximal de harina y semilla *Vitis tiliifolia*.

Table 1. Physico-chemical and proximate analysis of flour and seed of *Vitis tiliifolia*.

Propiedades físico-químicas	Valor
Peso(g)*	0.15 $\pm$ 0.04
Longitud (mm)*	3.81 $\pm$ 0.22
Ancho (mm)*	3.03 $\pm$ 0.26
Espesor(mm)*	2.11 $\pm$ 0.19
Humedad (%)	75 $\pm$ 5.1
Actividad de agua(25°C)	0.572 $\pm$ 0
Cenizas (%)	1.43 $\pm$ 0.1
Acidez total titulable (%)	3.02 $\pm$ 0.05
Azúcares reductores (%)	5.82 $\pm$ 0.6
Proteínas (%)	0.23 $\pm$ 0.05
Grasa total (%)	17.5 $\pm$ 3.5
Fibra total dietaria (%)	4.15 $\pm$ 0.04

\*= peso, longitud, ancho y espesor fueron calculados sobre el promedio de 100 semillas. Los valores en la harina de semilla de *Vitis tiliifolia* se expresaron como el promedio  $\pm$  SD de tres replicas.

### Analysis of chemical compounds present in the seed meal

In order to obtain compounds that contribute to the high antioxidant activity, the polyphenols present in the seed meal were identified and quantified (Table 2). Seven compounds were isolated, and their chemical structures were identified with the basis of the spectral data of ultra high resolution chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS). A mass spectrometry protocol was used in multiple reaction monitoring mode of operation (MRM, MS), in a retention time range of 1.5 to 46 min, collision energy between 10 and 30, with values of  $R^2 > 0.971$  linearity in the concentration range of 0.1 to 14 mM. From the methanolic extract, the two major compounds were: (-)-epicatechin (1 318.66  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and (+)-catechin (703.12  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), followed by trans-resveratrol (32.88  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), quercetin-3-glucoside (14.65  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), gallic

**Cuadro 2. Compuestos polifenólicos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) identificados en harina de *Vitis tiliifolia* usando cromatografía de ultra alta resolución-espectrometría de masas.**

**Table 2. Polyphenolic compounds ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) identified in *Vitis tiliifolia* flour using ultra high resolution chromatography-mass spectrometry.**

Compuestos	Cuantificación ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Ácido galico	3.32 $\pm$ 0.49
(+)-Catequina	703.12 $\pm$ 12.85
(-)-Epicatequina	1318.66 $\pm$ 19.08
Vainillina	0.83 $\pm$ 0
Quercetina-3-D-galactosido	1.38 $\pm$ 0.05
Quercetina-3-glucosido	14.65 $\pm$ 0.49
Trans-resveratrol	32.88 $\pm$ 0.36

Los datos son expresados en promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Se ha reportado que los grupos fenólicos presentes en productos naturales son responsables de la deslocalización electrónica a la cual se atribuye la capacidad de captura de radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1996). Asimismo, la actividad antioxidante de los polifenoles se atribuye principalmente a su potente actividad como quelatante de metales y actividad antirradical. Frecuentemente se ha reportado que estos compuestos antioxidantes están presentes en uvas y proporcionan actividad antimutagénica, anti-inflamatoria y antiproliferativa. De igual manera, se ha demostrado que el resveratrol es un inhibidor de la ciclooxigenasa y los hidroperóxidos en varios sistemas experimentales (Aziz *et al.*, 2003).

### Propiedades fisicoquímicas del aceite

El Cuadro 3 muestra las propiedades fisicoquímicas y de calidad del extracto de aceite que fueron preparados usando el extractor Soxhlet. Los parámetros de color de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  fueron de 1.64, 1.06 y 1.72, respectivamente. No existen estándares de color para aceite de semilla de *Vitis* y estos valores podrían ser utilizados para la evaluación de su calidad. El parámetro  $a^*$  está en el mismo rango que lo reportado para el aceite de semilla de chía (Ixtana *et al.*, 2011). Las muestras mostraron valores positivos para el parámetro  $b^*$ , característico de colores de color amarillo claro. Este color está asociado con el contenido total de pigmentos, tales como carotenoides. La densidad del aceite de semillas de *Vitis tiliifolia* fue de 0.909  $\text{g mL}^{-1}$ . Este valor es similar a lo reportado para el aceite de soya, pero es ligeramente menor al rango de densidad (0.92-0.926) para el

acid (3.32  $\pm$  0.49  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), quercetin-3-D-galactoside (1.38  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and lastly vanillin (0.83  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), all contribute to antioxidant activity in other types of grapes (Maier *et al.*, 2009).

It has been reported that phenolic groups present in natural products are responsible for electron delocalization to which the free radical harvesting capacity is attributed (Rice-Evans *et al.*, 1996). Likewise, the antioxidant activity of polyphenols is mainly attributed to their potent activity as a metal chelator and antiradical activity. It has often been reported that these antioxidant compounds are present in grapes and provide antimutagenic, anti-inflammatory and antiproliferative activity. Similarly, it has been shown that resveratrol is a cyclooxygenase and hydroperoxides inhibitor in several experimental systems (Aziz *et al.*, 2003).

### Physicochemical properties of oil

Table 3 shows the physicochemical and quality properties of the oil extract that were prepared using the Soxhlet extractor. The color parameters of  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  were 1.64, 1.06 and 1.72, respectively. There are no color standards for *Vitis* seed oil and these values could be used for quality assessment. The parameter  $a^*$  is within the same range as that reported for chia seed oil (Ixtana *et al.*, 2011). The samples showed positive values for parameter  $b^*$ , characteristic of light yellow colors. This color is associated with the total content of pigments, such as carotenoids. Density of *Vitis tiliifolia* seed oil was 0.909  $\text{g mL}^{-1}$ . This value is similar to that reported for soybean oil, but is slightly lower than the density range (0.92-0.926) for oil from the *Vitis vinifera* L. seeds (FAO/WHO, 1999). This difference in density may be due to oil extraction method or the difference in the origin and type of seed (Tsaknis *et al.*, 1999). Water activity (0.65) and specific weight (0.926  $\text{g mL}^{-1}$ ) were higher than those reported for other oils such as canola and linseed oil (Yin and Sathivel, 2010).

The moisture content (0.6%) of the oil was slightly higher than that reported (0.4 to 0.58%) for edible oils, indicating greater susceptibility to degradation such as hydrolysis of lipids that may cause undesirable oxidation reactions (Bhattacharya *et al.*, 2008; Adedokun and Onuegbu, 2011). The refractive index of *Vitis tiliifolia* seed oil was similar to Chia oil (1.49) and jatropha oil (1.47), indicating that it contains similar amount of free fatty acids (Eromosele and Pascal, 2003; Iztaina *et al.*, 2011). Furthermore, the saponification index of *Vitis tiliifolia* oil was 190.01  $\text{mg KOH g}^{-1}$ , this value is similar to the saponification value of canola oil (Eskin *et al.*, 1996).



aceite de las semillas de *Vitis vinifera* L. (FAO/OMS, 1999). Esta diferencia en la densidad de los aceites pudiera deberse al método de extracción o a la diferencia al origen y tipo de semilla (Tsaknis *et al.*, 1999). La actividad de agua (0.65) y el peso específico (0.926 g mL<sup>-1</sup>) fueron mayores que los reportados para otros aceites como el aceite de canola y linaza (Yin y Sathivel, 2010).

El contenido de humedad (0.6%) del aceite fue ligeramente mayor que lo reportado (0.4 a 0.58%) para aceites comestibles, lo que indica mayor susceptibilidad a la degradación tal como la hidrólisis de los lípidos que pueden causar reacciones de oxidación indeseables (Bhattacharya *et al.*, 2008; Adedokun y Onuegbu 2011). El índice de refracción del aceite de la semilla de *Vitis tiliifolia* fue similar al de aceite de Chía (1.49) y aceite de *Jatropha* (1.47), lo que indica que contienen cantidad similares de ácidos grasos libres (Eromosele y Pascal, 2003; Iztaina *et al.*, 2011). Por otro lado, el índice de saponificación del aceite de *Vitis tiliifolia* fue 190.01 mg KOH g<sup>-1</sup>, este valor es similar al valor de saponificación de aceite de canola (Eskin *et al.*, 1996). La viscosidad a 25 °C encontrada para este aceite (0.068 Pa s) se encontró en el rango reportado para algunos aceites comestibles (Hernández *et al.*, 2013). El aceite tuvo un índice de acidez (1.02%) ligeramente mayor que el reportado para otros aceites tales como el aceite comestible de *Dacryodes edulis* (Adedokun and Onuegbu, 2011), pero menor a la de los aceites refinados y los aceites prensados en frío (FAO-OMS, 1999).

Champe y Harvey (1994) reportaron que la medición de acidez está en relación a la cantidad de ácidos grasos libres y sugiere un buen manejo poscosecha y un bajo contenido de humedad en el aceite. El índice de yodo encontrado (68.75 g I<sub>2</sub>/100 g) es menor al que se tiene como referencia para los aceites de semillas de uva (FAO-OMS, 1999), pero es mayor al reportado para otros tipos de aceites comestibles (Adedokun and Onuegbu, 2011), y para aceites de uva silvestre *Vitis* spp. (57.9 g I<sub>2</sub>/100 g) (Franco-Mora *et al.*, 2015), lo que podría suponer que este comportamiento es característico de este tipo de uva. A su vez, el valor de peróxido mide los hidroperóxidos producidos por la oxidación de los aceites (Abbas *et al.*, 2008).

Los valores obtenidos para el índice de peróxidos fueron mayores a los mínimos establecidos como estándar de referencia (hasta 10 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de aceite) y que a los valores establecidos para los aceites prensados en frío y vírgenes (hasta 15 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de aceite) (FAO-OMS, 1999). De acuerdo a

The viscosity at 25 °C found for this oil (0.068 Pa s) was found within the range reported for some edible oils (Hernández *et al.*, 2013) range. The oil had an acid value (1.02%) slightly higher than that reported for other oils such as *Dacryodes edulis* edible oil (Adedokun and Onuegbu, 2011), but lower than the refined oils and cold pressed oils (FAO-OMS, 1999).

### Cuadro 3. Parámetros fisicoquímicos del aceite extraído por Soxhlet de *Vitis tiliifolia*.

Table 3. Physicochemical parameters of oil extracted by Soxhlet from *Vitis tiliifolia*.

Propiedades fisicoquímicas	Valor
Densidad (g mL <sup>-1</sup> )	0.9 ± 0.02
Peso específico (g mL <sup>-1</sup> )	0.91 ± 0.043
Humedad (%)	0.6 ± 0.1
Actividad de agua (25°C)	0.65 ± 0.05
Índice de yodo (g I <sub>2</sub> 100 g <sup>-1</sup> )	68.51 ± 1.25
Ácidos grasos libres (%)	0.51 ± 0.08
Índice de saponificación (mg KOH g <sup>-1</sup> )	190.01 ± 2.5
Viscosidad (Pa s) (25°C)	0.068 ± 0.009
Índice de refracción (40°C)	1.49 ± 0.01
K <sub>232</sub>	1.75
K <sub>268</sub>	0.35
Color	
a*	1.06 ± 0.42
b*	1.72 ± 0.05
L*	1.64 ± 0.31
Ángulo matiz (°)	65 ± 7.82
Saturación de color	23.02 ± 0.01
Índice de peróxido (meq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> aceite)	20 ± 0.8

Los datos son expresados en promedio ± desviación estándar (n= 3).

Champe and Harvey (1994) reported that the acidity measurement is relative to the amount of free fatty acids and suggests a good post-harvest handling and a low moisture content in the oil. The iodine index found (68.75 g I<sub>2</sub>/100 g) is lower than the reference for grapeseed oils (FAO-OMS, 1999), but is higher than what has been reported for other types of edible oils (Adedokun and Onuegbu, 2011), and for *Vitis* spp. wild grape oils (57.9 g I<sub>2</sub>/100 g) (Franco-Mora *et al.*, 2015), which could mean that this behavior is characteristic of this grape. In turn, the peroxide value measures hydroperoxides produced by oils oxidation (Abbas *et al.*, 2008).

The values obtained for the peroxide index were higher than the minimum established as the reference standard (up to 10 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> oil) and than the values set for the cold pressed and

esto, algunos autores reportan que es importante refinar los aceites con el fin de obtener productos con propiedades deseables y aceptables que extenderán su vida útil (Yin y Sathivel, 2010). Por otro lado, los coeficientes de extinción específicos tuvieron valores de 1.72 y 0.35 para  $K_{232}$  y  $K_{268}$ , respectivamente, revelando el deterioro oxidativo del aceite (Yoon *et al.*, 1985). El coeficiente de extinción específica a 232 nm ( $K_{232}$ ) está relacionado con el grado de oxidación primaria del aceite. Este coeficiente es también un indicador de la conjugación de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que  $K_{268}$  está relacionado con los productos de oxidación secundarios responsables de malos sabores.

### Perfil de ácidos grasos del aceite

El Cuadro 4 muestra la composición de ácidos grasos de aceite de semilla de *Vitis tiliifolia*. El contenido de ácidos grasos saturados totales fue aproximadamente (9.35%). Sin embargo, en el aceite se encontró un alto nivel de ácidos grasos insaturados (90.59%). La concentración de ácidos grasos saturados fue de ácido palmítico (6.95%), ácido esteárico (2.21%), ácido araquidónico (0.09%), ácido láurico (0.05%) y ácido mirístico (0.05%). Entre los ácidos grasos poliinsaturados, se encontró en proporción más alta el ácido linoleico ( $\Omega$ -6, 84.73%), seguido de ácido oleico ( $\Omega$ -9, 5.83%), y ácido gondoico ( $\Omega$ -11, 0.03%). El contenido de ácido linoleico fue cercano a lo reportado para aceite de semilla de *Oecopetalum mexicanum* (Hernández *et al.*, 2013). Sin embargo, para su uso como aditivo o suplemento alimenticio es necesario considerar que debe haber un balance determinado entre ácidos grasos ( $\Omega$ -6/ $\Omega$ -3) (Pisani *et al.*, 2015).

### Compuestos y actividad antioxidante del aceite

El Cuadro 5 muestra los componentes químicos y las propiedades antioxidantes de los extractos realizados con etanol: agua [3:1; v:v] y metanol: HCl (0.01%). La actividad antioxidante *in vitro* del aceite de semilla de *Vitis tiliifolia* se evaluó a través de la capacidad de captura del radical DPPH; actividad antioxidante se expresado como el porcentaje de oxidación de  $\beta$ -caroteno/linoleico y a través del poder reductor.

### Concentración de polifenoles

Los compuestos fenólicos totales son un grupo importante de metabolitos secundarios presentes en las semillas. Por lo general, son abundantes en las uvas y desempeñan un

virgin oils (up to 15 meq  $O_2$   $kg^{-1}$  of oil) (FAO-OMS, 1999). According to this, some authors report that it is important to refine the oils in order to obtain products with desirable and acceptable properties that would extend its useful life (Yin and Sathivel, 2010). Furthermore, specific extinction coefficients had values of 1.72 and 0.35 for  $K_{232}$  and  $K_{268}$ , respectively, revealing the oxidative deterioration of the oil (Yoon *et al.*, 1985). The specific extinction coefficient at 232 nm ( $K_{232}$ ) is related to the grade of oil oxidation. This ratio is also an indicator of the polyunsaturated fatty acid conjugation, while  $K_{268}$  is related to secondary oxidation products responsible for off-flavors.

### Oil fatty acid profile

Table 4 shows the fatty acid composition of *Vitis tiliifolia* seed oil. The content of total saturated fatty acids was approximately (9.35%). However, a high level of unsaturated fatty acids (90.59%) was found in the oil. The concentration of saturated fatty acids was of palmitic acid (6.95%), stearic acid (2.21%), arachidonic acid (0.09%), lauric acid (0.05%) and myristic acid (0.05%). Among the polyunsaturated fatty acids, linoleic acid ( $\Omega$ -6, 84.73%), followed by oleic acid ( $\Omega$ -9, 5.83%) and gondoic acid ( $\Omega$ -11, 0.03%) were found in the highest proportion. The linoleic acid content was close to that reported for seed oil *Oecopetalum mexicanum* (Hernández *et al.*, 2013), however, for its use as an additive or dietary supplement it is necessary to consider that there must be a certain balance between fatty acids ( $\Omega$ -6/ $\Omega$ -3) (Pisani *et al.*, 2015).

### Cuadro 4. Composición de perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de *Vitis tiliifolia*.

Table 4. Composition of the fatty acid profile of *Vitis tiliifolia* seed oil.

Núm.	Tiempo de retención	Compuesto	Area relativa (%)
1	8.68	Ácido dodecanoico	0.05
2	10.97	Ácido tetradecanoico	0.05
3	13.46	Ácido hexadecanoico	6.95
4	16.865	Ácido 9,12-octadecadienoico	84.73
5	16.933	Ácido (z)-9-octadecenoico	5.83
6	17.334	Ácido octadecanoico	2.21
7	22.87	Ácido 11-eicosenoico	0.03
8	23.86	Ácido eicosanoico	0.09

Los ácidos grasos del aceite fueron identificados en un espectro de masas de acuerdo al tiempo de retención y base de datos NIST.

papel importante en la calidad y el valor nutricional de las semillas de uva. El rango de compuestos fenólicos totales en el extracto de etanol:agua (8.89 mg EAG g<sup>-1</sup> de extracto) fue mayor que en el extracto metanol:HCl (7.4 mg EAG g<sup>-1</sup> de extracto). Estos valores fueron más bajos que lo que se ha reportado para extractos de aceite de *Vitis vinifera* y aceite de la variedad de uva roja (Apostolou *et al.*, 2013). Estas diferencias en la concentración de compuestos fenólicos en los extractos líquidos podrían depender de la afinidad de los compuestos polifenólicos a un disolvente particular, que a su vez depende de la variedad de uva. Además, ésta concentración puede ser influenciada por factores climáticos y geográficos, prácticas culturales, y el estado de maduración (Burin *et al.*, 2014), así como por el tipo y proporción de disolventes utilizados en la extracción, el tipo de extracción y el tratamiento utilizado.

**Cuadro 5. Composición química y actividad antioxidante semilla de *Vitis tiliifolia* en los extractos obtenidos usando diferentes mezclas de disolventes.**

**Table 5. Chemical composition and antioxidant activity in *Vitis tiliifolia* seed of extracts obtained using different solvent mixtures.**

Materiales	Etanol:agua (3:1) (v:v)	Metanol:HCl 0.1% (v:v)
Polifenoles totales (mg EAG g <sup>-1</sup> extracto)	8.89 ±0.5 c	7.4 ±1.3 b
Carotenoides totales (mg kg <sup>-1</sup> extracto)	0.1 ±0.02 a	0.25 ±0.01 b
Inhibición de radical DPPH (%)	95.56 ±2.4 a	99.33 ±1.5 a
Actividad antioxidante (%)*	82 ±5 a	90 ±4.3 a
Poder reductor (FRAP, mg ET g <sup>-1</sup> extracto)	26.15 ±1.5 b	22.4 ±1.9 a

\*= expresada como porcentaje de oxidación de β-caroteno/linoleico. EAG= equivalentes de ácido gálico; ET= mg equivalentes de Trolox. Valores con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Concentración de carotenos**

Otra clase importante compuestos derivados del aceite de semilla de uva son los carotenoides. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y están presentes en cantidades que variaron de 0.25 mg kg<sup>-1</sup> a 0.1 mg kg<sup>-1</sup> para el extracto etanol:agua (3:1; v:v) y metanol:HCl (0.01%) respectivamente. Estos valores son similares a los reportados

**Compounds and antioxidant activity of oil**

Table 5 shows the chemical components and antioxidant properties of extracts made with ethanol: water [3:1; v:v] and methanol: HCl (0.01%). The antioxidant activity *in vitro* of *Vitis tiliifolia* seed oil was evaluated through the capability of capturing DPPH radical; antioxidant activity is expressed as the percentage of β-carotene/linoleic oxidation and through the reducing power.

**Concentration of polyphenols**

Total phenolic compounds are an important group of secondary metabolites present in seeds. They are usually abundant in grapes and play an important role in the quality and nutritional value of grape seeds. The range of total phenolic compounds in the extract of ethanol: water (8.89 mg EAG g<sup>-1</sup> extract) was higher than in methanol: HCl extract (7.4 mg EAG g<sup>-1</sup> extract). These values were lower than what has been reported for oil extracts from *Vitis vinifera* and oil of red grape variety (Apostolou *et al.*, 2013). These differences in the concentration of phenolic compounds in the liquid extracts could depend on the affinity of the polyphenolic compounds to a particular solvent, which in turn depends on the grape variety. Moreover, this concentration may be influenced by climatic and geographical factors, cultural practices and the maturation status (Burin *et al.*, 2014), and by the type and proportion of solvents used in extraction, the type of extraction and treatment used.

**Carotenes concentration**

Another important class of compounds derived from grape seed oil are carotenoids. These compounds have antioxidant activity and are present in amounts ranging from 0.25 mg kg<sup>-1</sup> to 0.1 mg kg<sup>-1</sup> for the ethanol:water (3:1; v:v) extract and methanol:HCl (0.01%) respectively. These values are similar to those reported for soybean (0.3 mg kg<sup>-1</sup>), sunflower (0.1 mg kg<sup>-1</sup>) and flaxseed (0.7 mg kg<sup>-1</sup>), but less than rapeseed (1.9 mg kg<sup>-1</sup>) (Tuberoso *et al.*, 2007).

**Inhibition of DPPH radical of the oil**

The DPPH radical capture activity was 95.56% and 99.33% for the extract of ethanol:water and methanol:HCl, respectively. Both extracts showed no significant differences in DPPH radical capture, which can be expected from the concentrations of bioactive compounds, such as total

para soya (0.3 mg kg<sup>-1</sup>), girasol (0.1 mg kg<sup>-1</sup>) y semillas de linaza (0.7 mg kg<sup>-1</sup>), pero inferior a la semilla de colza (1.9 mg kg<sup>-1</sup>) (tuberoso *et al.*, 2007).

### Inhibición de radical DPPH del aceite

La actividad de captura de radicales DPPH fue 95.56% y 99.33% para el extracto de etanol:agua y metanol:HCl, respectivamente. Ambos extractos no mostraron diferencias significativas en la captura de radical DPPH, lo que puede esperarse de las concentraciones de los compuestos bioactivos, tales como los polifenoles y carotenoides totales. Por lo tanto, los datos obtenidos revelan que estos compuestos actúan como inhibidores de radicales libres y confieren actividad antioxidante en este aceite de semilla de uva.

### Actividad antioxidante del aceite (oxidación de β-caroteno/ácido linoleico)

Se determinó la actividad antioxidante basada en la inhibición de la oxidación de β-caroteno y ácido linoleico. Esta actividad varió desde 82% hasta 90% en los extractos etanol:agua y metanol:HCl, respectivamente, indicando en ambas muestras que la presencia de compuestos antioxidantes pueden obstaculizar el grado de la decoloración de β-caroteno por la neutralización del radical libre de linoleato y otros radicales libres formados en el sistema (Jayaprakasha *et al.*, 2001).

### Poder reductor (FRAP) en el aceite

El ensayo FRAP mostró los valores altos para ambos extractos de aceite de semillas. Los valores de FRAP variaron 22.40 a 26.15 mg ET g<sup>-1</sup> de extracto de etanol:agua y metanol:HCl, respectivamente. Los resultados indican que la actividad antioxidante de los extractos de *Vitis tiliifolia* parece ser debido a la presencia de polifenoles. Estos polifenoles pueden actuar de manera similar a las reductonas, mediante la donación de electrones y reaccionar con los radicales libres para convertirlos en productos más estables y terminando con ello la reacción en cadena de los radicales libres (Jayaprakasha *et al.*, 2001). De la misma manera, el poder reductor fue mayor en el extracto etanol:agua, lo que indica la presencia de compuestos que actúan como agentes reductores, demostrada por la reducción del ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) a ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>). Se encontró una alta correlación entre el contenido de polifenoles con la capacidad de captura del radical DPPH (R<sup>2</sup>= 0.86) y con la actividad

polyphenols and carotenoids. Therefore, the data obtained reveal that these compounds act as inhibitors of free radicals and confer antioxidant activity on this grape seed oil.

### Antioxidant activity of the oil (oxidation of β-carotene/linoleic acid)

Antioxidant activity was determined based on the inhibition of the oxidation of β-carotene and linoleic acid. This activity varied from 82% to 90% in the ethanol: water and methanol: HCl extracts respectively, indicating in both samples that the presence of antioxidant compounds may hinder the degree of β-carotene discoloration by neutralizing the free radical of linoleate and other free radicals formed in the system (Jayaprakasha *et al.*, 2001).

### Reducing power (FRAP) in the oil

The FRAP test showed high values for both seed oil extracts. FRAP values ranged from 22.4 to 26.15 mg ET g<sup>-1</sup> ethanol: water and methanol:HCl extract, respectively. The results indicate that the antioxidant activity of the extracts of *Vitis tiliifolia* seems to be due to the presence of polyphenols. These polyphenols can act in a similar way to reductones, by electron donation and react with free radicals to become more stable products and thereby terminating the chain reaction of free radicals (Jayaprakasha *et al.*, 2001). Similarly, the reducing power was greater in the ethanol:water extract, indicating the presence of compounds which act as reducing agents, as evidenced by the reduction of ferric ion (Fe<sup>3+</sup>) to ferrous ion (Fe<sup>2+</sup>). A high correlation between polyphenol content with the ability to capture the DPPH radical (R<sup>2</sup>= 0.86) and with antioxidant activity estimated by β-carotene-linoleic acid oxidation (R<sup>2</sup>= 0.89) was found. Both extracts showed antioxidant activity statistically equal (*p*>0.05), indicating that the compounds present in both extracts have the ability to trap the DPPH radical and inhibit lipid peroxidation. The data obtained reveal that the compounds present in the extracts are inhibitors of free radicals and primary antioxidants that react with free radicals.

## Conclusions

Oil and flour from the *Vitis tiliifolia* seeds have compounds with functional properties that propose it for possible commercial and industrial uses. The oil is rich in linoleic acid and other compounds that give it antioxidant activity.

antioxidante estimada a través de la oxidación  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico ( $R^2= 0.89$ ). Ambos extractos mostraron actividad antioxidante estadísticamente iguales ( $p > 0.05$ ), indicando que los compuestos presentes en ambos extractos tienen la capacidad de atrapar el radical DPPH e inhibir la peroxidación lipídica. Los datos obtenidos revelan que los compuestos presentes en los extractos son inhibidores de radicales libres y antioxidantes primarios que reaccionan con los radicales libres.

## Conclusiones

El aceite y la harina obtenida de las semillas de *Vitis tiliifolia* poseen compuestos con propiedades funcionales que lo proponen para posibles usos comerciales e industriales. El aceite es rico en ácido linoleico y otros compuestos que le confieren actividad antioxidante. Las propiedades fisicoquímicas son adecuadas para su uso en la industria de alimentos y otras áreas afines. La harina de la semilla es rica en polifenoles, tales como catequina, epicatequina y *trans*-resveratrol quienes fueron los más abundantes. Estos antioxidantes presentes en la semilla pueden extraerse utilizando, ya sea, una mezcla de etanol:agua (3:1; v:v) o metanol:HCl (0.01%).

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Alimentos (L-IDEA) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## Literatura citada

- Abbas, M.; Abu, M.; Kumar, R.; Yeasmin, S. and Mohal, A. 2008. Comparative study on characteristics of seed oils and nutritional composition of seed from different varieties of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivated in Bangladesh. *Asian J. Biochem.* 3(4):203-212.
- Adedokun, I. I. and Onuegbu, N. C. 2011. The physical properties of pulp and chemical characteristics of edible oil extracted from the pulp of African pear (*Dacryodes edulis*). *Pakistan J. Nutr.* 10(6):558-560.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. Official methods of analysis. Maryland, USA.

The physicochemical properties are suitable for use in the food industry and other related areas. Seed flour is rich in polyphenols, such as catechin, epicatechin and *trans*-resveratrol that were the most abundant. These antioxidants present in the seed can be extracted using either a mixture of ethanol:water (3:1; v:v) or methanol:HCl (0.01%).

*End of the English version*



- AOCS (American Oil Chemists Society). 1998. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5<sup>th</sup> Ed.. Champaign, IL.
- Apostolou, A.; Stagos, D.; Galitsiou, E.; Spyrou, A.; Haroutounian, S.; Portesis, K.; Trizoglou, I.; Hayes, A. W.; Tsatsakis, A. M. and Kouretas, D. 2013. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chemical Toxicol.* 61:60-68.
- Arellano, J. A.; Flores, J. S.; Tun, J. and Cruz, M. M. 2003. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. *Etnoflora Yucatanense Fascículo 20*. Yucatán: UADY. Mérida, México. 1-815 pp.
- Ayoola, P. B. and Adeyeye, A. 2010. Effect of heating on the chemical composition and physico-chemical properties of *Arachis hypogea* (groundnut) seed flour and oil. *Pak. J. Nutr.* 9(8):751-754.
- Aziz, M. H.; Kumar, R. and Ahmad, N. 2003. Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (Review). *Inter. J. Oncology.* 23:17-28.
- Bhattacharya, A. B.; Sajilata, M. G. and Sibghal, R. S. 2008. Lipid profile of foods fried in thermally polymerized palm oil. *Food Chemistry.* 109:808-812.
- Brand, W. W.; Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology.* 28:25-30.
- Bravo, L., and Saura, C. F. 1998. Characterization of dietary fiber and the *in vitro* indigestible fraction of grape pomace. *Am. J. Enol. Viticulture.* 49:135-141.
- Burin, V. M.; Ferreira, L. N. E.; Panceri, C. P. and Bordignon, L. M. T. 2014. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods. *Microchemical J.* 114:155-163.
- Champe, P. C. and Harvey, R. A. 1994. Lippincott's illustrated reviews: biochemistry. 2nd (Ed.). Lippincott Raven Publishers. New Jersey, USA. 303-340 pp.
- Crews, C.; Hough, P.; Godward, J.; Brereton, P.; Lees, M.; Guiet, S. and Winkelmann, W. 2006. Quantitation of the main constituents of some authentic grape seed oils of different origin. *J. Agric. Food Chem.* 54:6261-6265.
- Da Porto, C.; Porretto, E. and Decorti, D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry.* 20:1076-1080.

- Eromosele, C. O. and Pascal, N. H. 2003. Characterization and viscosity parameters of seed oils from plants. *J. Bio. Technol.* 86:203-205.
- Eskin, N. A. M.; McDonald, B. E.; Przybylski, R.; Malcolmson, L. J.; Scarth, R.; Mag, T.; Ward, K. and Aldoph, D. 1996. Canola Oil. *In: Bailey's industrial oil & fat products.* Y. H. Hui, (Eds.). Edible oil and fat products: oils and oil seeds. 5<sup>th</sup> edition. John Wiley and Sons. Inc. New York, USA. (2):1-96.
- FAO/OMS (Food and Agriculture Organization /Organización Mundial de la Salud). 1999. CODEX Stan 210. Norma del codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales, codex alimentarius official standards, Canadá. 1-14 pp.
- Fernández, C. C. 2009. Plantas comestibles de Centroamérica. Instituto Nacional de Biodiversidad. Santo Domingo de Heredia. Costa Rica. <http://www.inbio.ac.cr/webca/biodiversidad/regional/plantascomestibles-ca-ve.pdf>.
- Franco, M. O.; Salomón, C. J.; Morales, A. A.; Castañeda, V. A. and Rubí, A. M. 2015. Fatty acids and parameters of quality in the oil of wild grapes (*Vitis* spp.). *Sci. Agrop.* 6(4):271-278.
- Göktürk, N. and Akkurt, M. 2001. Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Tur. J. Agric. Fores.* 25:163-168.
- Hernandez, B.; Luna, G.; García, O.; Mendoza, M. R.; Azuara, E.; Beristain, C. I. and Jimenez, M. 2013. Extraction and characterization of *Oecopetalum mexicanum* seed oil. *Industrial Crops and Products.* 43:355-359.
- Ibarra, M. G. y Sinaca, C. S. 1996. Lista comentada de plantas de la estación de biología tropical. Los Tuxtlas, Veracruz, México: (Violaceae-Zingiberaceae). *Rev. Biol. Trop.* 427-447.
- Ixtaina, V. Y.; Martínez, M. L.; Spotorno, V.; Mateo, C. M.; Maestri, D. M.; Diehl, B. W. K.; Nolasco, S. M. and Tomás, M. C. 2011. Characterization of chia seed oil obtained by pressing and solvent extraction. *J. Food Comp. Anal.* 24:166-174.
- Jayaprakasha, G. K.; Singh, R. P. and Sakariah, K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry.* 73:285-290.
- Jiang, F. M.; Yu, L. F.; Min, Y. Q.; Xi, F. Z. and Zhen, W. Z. 2012. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County. *Food Chemistry.* 134:2049-2056.
- Lascrain, M.; Avendaño, S.; Del Amo, S. y Niembro, A. 2010. Guía de frutos silvestres comestibles en Veracruz. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, Conafor- Conacyt, México. 119p.
- López, A.; Castellote, A. I. and López, M. C. 2001. Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. *Chromatographia.* 54(11-12):743-747.
- Maier, T.; Schieber, A.; Kammerer, D. R. and Carle, R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry.* 112:551-559.
- Oboh, G.; Raddatz, H. and Henle, T. 2009. Characterization of the antioxidant properties of hydrophilic and lipophilic extracts of jute (*Corchorus olitorius*) leaf. *Inter. J. Food Sci. Nutr.* 60:124-134.
- Ohnishi, M.; Hirose, S.; Kawaguchi, M.; Ito, S. and Fujino, Y. 1990. Chemical composition of lipids. Especially triacylglycerol in grape seeds. *Agric. Biol. Chem.* 54(4):1032-1042.
- Oluba, O. M.; Ogunlowo, Y. R.; Ojeh, G. C.; Adebisi, K. E.; Eidangbe, G. O. and Isiosio, I. O. 2008. Physicochemical properties and fatty acid composition of *Citrullus lanatus* (Egusi Melon) seed oil. *J. Biol. Sci.* 8(4):814-817.
- Pardo, J. E.; Fernández, E.; Rubio, M. and Alvarruiz, A. 2009. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111:188-193.
- Pisani, D. F.; Amri, E. Z. and Ailhaud, G. 2015. Disequilibrium of polyunsaturated fatty acids status and its dual effect in modulating adipose tissue development and functions. *Oilseeds and Fat Crops and Lipids.* 22(4):D405.
- Rice, E. C.; Miller, N. J. and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine.* 20:933-956.
- Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T.; Kataoka, S. and Yamaji, N. 1998. Antulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46(4):1460-1464.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Tsaknis, J.; Lalas, S.; Gergis, V.; Dourtoglou, V; Spilitois V. 1999. Characterization of Moringa oleifera variety Mbololo seed oil of Kenya. *J. Agric. Food Chem.* 47:4495-4499.
- Tuberoso, C.; Kowalczyk, A.; Sarritzu, E. and Cabras, P. 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry,* 103:1494-1501.
- Yen, G. C. and Duh, P. D. 1993. Antioxidative properties of methanolic extract from Peanut Hull. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:383-386.
- Yin, H.; and Sathivel S. 2010. Physical properties and oxidation rates of unrefined menhaden oil (*Brevoortia patronus*). *Food Engineering and Physical Properties.* 75(3):163-168.
- Yoon, S. H.; Kim, S. K.; Shin, M. G. and Kim, K. H. 1985. Comparative study of physical methods for lipid oxidation measurement. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68:1487-1489.