

Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2016, 33: 39-57

Caracterización fisicoquímica y actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malvasía

Physicochemical characterization and antibacterial activity of grape seed oil (*Vitis vinifera*) variety Malvasía

María Berradre, Andreina Vides, Graciela Ojeda de Rodríguez, Laura Soto, Betzabé Sulbarán, Viluzca Fernández y Jorge Peña

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

Resumen

Las semillas de uva representan alrededor del 15% del desecho generado en la producción de vino, por lo que son vendidas para la extracción de aceite. En esta investigación se determinaron las características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malvasía. La extracción del aceite se realizó empleando Soxhlet, n-hexano como solvente de extracción y un tiempo de extracción de cinco horas. El aceite se caracterizó de acuerdo a los métodos AOAC y COVENIN. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar contra las cepas bacterianas *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25823, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218, la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en caldo. El máximo rendimiento de aceite fue 8,90% m.m⁻¹. La características físicas y químicas: densidad relativa (0,8523); índice de refracción (1,4660); acidez titulable (1,32% ácido oleico); índice de saponificación (245,7 mg KOH.g⁻¹); índice de peróxidos (112,7 meq O₂.kg⁻¹) e índice de yodo (153,54 cgI₂.g⁻¹), estuvieron dentro de los límites establecidos por las normas venezolanas. Con respecto a la actividad antibacteriana, el aceite extraído presentó actividad del tipo bactericida contra todas las bacterias evaluadas y CIM para *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* fue 10% mientras que para *B. subtilis* fue 40%. Los resultados indicaron que el aceite de semillas de uva variedad *Malvasía* podría ser utilizado como potencial aditivo en alimentos para combatir bacterias patógenas.

Palabras clave: aceite, semillas de uva, actividad antibacteriana y concentración inhibitoria mínima.

Abstract

The seeds of grape represent about 15% of solid waste produced in the wine industry; thus, this is the reason that seeds are traditionally sold for the oil extraction. In this research were determined the physicochemical characteristics and the antibacterial activity of oil grape seed (*Vitis vinifera*), Malvasia variety. The oil was extracted by the Soxhlet method, using n-hexane as a solvent and extraction time of 5 hours. The extracted oil was characterized physicochemically by COVENIN and AOAC methods. The antibacterial activity was determined by the agar diffusion method against bacterial strains *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25823, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 35218. The minimum inhibitory concentration (MIC) was also determined by the broth dilution method. The maximum yield of grape seed oil was 8.90% p.p⁻¹ at 5 hours of extraction. The physicochemical characterization of the oil was relative density (0.8523), refractive index (1.4660), titratable acidity (1.32% oleic acid), saponification value (245.7 mg KOH.g⁻¹); index peroxide (112.7 meq O₂.kg⁻¹) and index of Iodine (153.54 cgI₂.g⁻¹). With regard to the antibacterial activity, the extracted oil had activity type bactericidal against all bacterial type bacteria tested and MIC for *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* was 10% while for *B. subtilis* was 40%. The results indicated that the grape seed oil Malvasia variety can be used as food additive to combat potential pathogenic bacteria.

Key word: oil, seeds of grape, antibacterial activity, the minimum inhibitory concentration.

Introducción

Las uvas (*Vitis vinifera* L.) producen las cosechas más grandes del mundo con una producción global alrededor de 69 millones de toneladas en 2006 (FAOSTAT, 2007) de la cual un 80% se empleó en la elaboración de vinos. Alrededor del 15% del desecho sólido generado durante este proceso de vinificación fueron semillas (Fiori, 2007), las cuales estuvieron constituidas por lípidos (13,0-18,4%), presentando un alto porcentaje de ácidos grasos polinsaturados, por lo cual podrían ser utilizadas para la extracción de aceite, un proceso que ha estado en curso de forma limitada en algunos lugares

Introduction

Grapes (*Vitis vinifera* L.) produce the biggest crops of the world with a worldwide production of 69 millions of tons in 2006 (FAOSTAT, 2007), out of which 80% is used in the elaboration of wines. Approximately 15% of the solid waste generated during the wining process are seeds (Fiori, 2007), which were constituted by lipids (13.0-18.4%), presenting a high percentage of polyunsaturated fatty acids; thus, can be used for extracting the oil, a process that has taken place in some places in a limited way and was performed using organic solvents (Parodo *et al.*, 2008).

y se realiza normalmente usando solventes orgánicos (Pardo *et al.*, 2008).

El aceite de semillas de uva ha sido caracterizado por un sabor ligero a fruta, alto punto de ebullición (216°C), alta digestibilidad, y un aumento leve en viscosidad cuando ha sido utilizado para freír. Desde el punto de vista alimenticio y terapéutico presenta un alto contenido de compuestos fenólicos (reconocidos por sus propiedades antioxidantes), de ácido linoleico (importante para la síntesis de las prostaglandinas, con influencia en la agregación de las plaquetas y procesos inflamatorios), y un alto contenido de vitamina E (ayuda a reducir el riesgo de arteroesclerosis), por lo que su consumo podría ser beneficioso para prevenir problemas del corazón y circulatorios (Guerra y Zúñiga, 2003; Pardo *et al.*, 2008).

Una amplia variedad de antimicrobianos naturales, han sido desarrollados a partir de los microorganismos, plantas y animales, muchos de los cuales, ya han sido empleados para la conservación de alimentos y otros están siendo investigados. La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especias, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. A estos antioxidantes naturales, especialmente los flavonoides, flavonoles, flavonones, catequinas, antocianinas y poliflavonoides, se les reporta como responsables de los siguientes efectos biológicos: antibacteriano, antiviral, antiinflamatorio y vasodilatador (Figuroa-Espinoza *et al.*, 2015; Cook y Samman, 1996).

La uva es uno de los principales cultivos frutales a nivel mundial, cuya cosecha es de aproximadamente 60

The oil of grape seeds is characterized by having a slight fruity taste, high boiling point (216°C), high digestibility, and a slight viscosity increment when used for frying. From the nutritious and therapeutic point of view, it has a high content of phenolic compounds (known by their antioxidant properties), linoleic acid (important for the synthesis of prostaglandins with an influence in the platelets and the inflammatory processes), and a high content of Vitamin E (helps reducing the risk of atherosclerosis); thus, its consumption might be beneficial for preventing heart and circulatory problems (Guerra and Zúñiga, 2003; Pardo *et al.*, 2008).

A wide variety of natural antimicrobials have been developed after the microorganisms, plants and animals, many of which have been employed for preserving the food and others are being investigated. Most of the compounds with antimicrobial activity found in plants, herbs and species are phenolic compounds, terpenes, aliphatic alcohol, aldehydes, ketones, acids and isoflavonoids. These natural antioxidants, specially flavonoids, flavonoles, flavonones, catechins, anthocyanin and polyflavonoids, are reported as the responsible of the following biologic effects: antibacterial, anti-viral, anti-inflammatory and vasodilator (Figuroa-Espinoza *et al.*, 2015; Cook and Samman, 1996).

Grape is one of the main fruit crops worldwide, which harvest corresponds to almost 60 millions of tons per year. Approximately 80% of the crop if used for wine, representing

millones de toneladas por año. Cerca del 80% de la cosecha es empleada para vinificación, representando el desecho de uvas el 20% de la biomasa de las uvas procesadas. Cerca de entre 5 a 9 millones de toneladas de desecho por año se generaron mundialmente producto de la vinificación, lo cual incrementó considerablemente la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), debido a la elevada carga de contaminación (alta cantidad de sustancias orgánicas como azúcares, taninos, polifenoles, polialcoholes, pectinas y lípidos; Lafka *et al.*, 2007).

Actualmente en Venezuela se generan alrededor de 1000 ton de desechos entre los viñedos, de la zona de Mara, estado Zulia y Bodegas Pomar, estado Lara, principales productores de vino en el país. Una parte de estos desechos son básicamente utilizados como compost para los propios viñedos de la zona, el resto se acumuló en pilas provocando contaminación ambiental, por lo que se planteó como alternativa el aprovechamiento de las semillas para la producción de aceites y de ésta manera el país ahorraría divisas, al no tener la necesidad de importar aditivos y preservantes para el control de microorganismos en alimentos, además de aportar antioxidantes (Berradre *et al.*, 2014) Por ello, en esta investigación se determinaron las características físicas y químicas y la actividad antibacteriana del aceite de semillas de uvas (*Vitis vinifera*) variedad Malvasía.

Materiales y métodos

Obtención de la muestra

Se recolectaron de forma aleatoria 150 kg de hollejo (piel, epicarpo) y semi-

the grape waste 20% of the processes grapes. Almost from 5 to 9 millions of waste tons were generated worldwide due to the wining process, which increased the chemical demand of oxygen (QDO) and the biochemical demand of oxygen (BDO), due to the high pollution rate (high quantity of organic substances such as sugar, tannins, polyphenols, polyalcohols, pectins and lipids; Lafka *et al.*, 2007).

Currently in Venezuela approximately 1000 tons of wastes are generated from the vineyards, Mara area, Zulia state and Pomar winery, Lara state, main wine producers in the country. A part of these wastes are basically used as compost for the own vineyards of the area, the rest was accumulated into stacks causing environmental pollution; thus, it was posed as an alternative the use of the seeds for producing oils; likewise, the country will save foreign currency because there is not the need of importing additives and preservatives for the control of microorganisms in food, besides of providing antioxidants (Berradre *et al.*, 2014). For this reason, in the current research were determined the physical and chemical characteristics and the antibacterial activity of the oil of grape seed (*Vitis vinifera*), Malvasía variety.

Materials and methods

Obtaining of the sample

One hundred and fifty kg of skin and seeds of grape (*Vitis vinifera*) were collected at random of the Malvasia variety (COVENIN 157:1989). The

llas de uva (*V. vinifera*) de la variedad Malvasía (COVENIN 157:1980). La recolección de las muestras se realizó posterior al proceso de prensado durante la vinificación en blanco. Las semillas se almacenaron en bolsas plásticas para ser trasladadas al laboratorio, donde se mantuvieron bajo refrigeración a 10°C hasta ser analizadas. Las uvas fueron cosechadas en enero del año 2008 en el Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Vitivinícola (CESID-Vitícola), ubicado en el municipio Mara del estado Zulia.

Tratamiento de las semillas de uva para la extracción del aceite

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

Rendimiento de aceite de semillas de uva

La extracción del aceite de las semillas de uva, se realizó mediante extracción Soxhlet, según lo reportado por García *et al.* (2003), empleando n-hexano (Riedel de Haën, Alemania) como solvente de extracción. Con la finalidad de obtener un mejor rendimiento de aceite, se realizaron ensayos de optimización de la extracción. Para ello se evaluaron tres muestras de 50,00±0,01 g, las cuales se sometieron a extracción durante 5, 6 y 7 horas, respectivamente, una temperatura de extracción de 65±2°C y un flujo del solvente de 30 gotas por minuto. Al ex-

sample collection took place after the pressing process during the wining process. The seeds stored in plastic bags for taking them to the laboratory, where kept under refrigeration at 10°C until their analyses. The grapes were harvested in January 2008, at the Socialist Center of Research and Wine Development (CESID-Viticola), in Mara, Zulia state.

Treatment of the grape seed for extracting the oil

The separation of the seeds and epicarp was done using a sieve until obtaining a product free of epicarp. Once performed this operation, the seeds were let dry at 25°C for eight days, and were later powdered using a commercial miller, and finally were taken to a 20 mesh sieve (opening diameter of 850 µm) following the methodology proposed by Camacho *et al.* (2005).

Oil yield of grape seeds

The oil extraction of grape seeds was performed through the Soxhlet extraction, according to the reported by García *et al.* (2003), using n-hexane (Riedel de Haën, Germany) as an extracting solvent. With the aim of obtaining a better yield of oil optimization essays were performed for the extraction. For this, three samples of 50.00±0.01 g, were evaluated, submitted to extraction during 5, 6 and 7 hours, respectively, an extraction temperature of 65±2°C and a solvent flow of 30 minutes per minute. The excess of solvent was eliminated to the oily extract at a temperature of 38°C, in a rotator evaporator (brand BUCHI model R-124). The oil obtained was stored in amber glass containers in inert N₂ atmosphere at an environmental temperature of 25°C until its posterior analyses.

tracto oleoso obtenido, se le eliminó el exceso de solvente a una temperatura de 38°C, en un evaporador rotatorio (marca BUCHI modelo R-124). El aceite obtenido fue almacenado en frascos de vidrio color ámbar en atmósfera de N₂ inerte a temperatura ambiente 25°C hasta su posterior análisis.

Caracterización física y química del aceite de semillas de uva

Se evaluaron las siguientes variables fisico-químicas aplicando los métodos recomendados por la AOAC (1980) y COVENIN (325:2001): Densidad relativa AOAC (28.004); índice de refracción AOAC (28.006); acidez titulable COVENIN (325:2001); índice de saponificación AOAC (28.026); índice de peróxido AOAC (28.023) e índice de yodo AOAC (28.021).

Determinación de la actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva por el método de difusión en agar

Cepas bacteriológicas empleadas

Se estudió la actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva frente a las cepas bacterianas *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25823, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 35218, las cuales fueron suministradas por el Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia.

Activación y preparación del inóculo

Las cepas bacterianas fueron cultivadas y mantenidas en caldo nutritivo (HIMEDIA, India) y refrigeradas a 4°C. La activación de la cepa y preparación del inóculo se realizó de acuerdo

Physical and chemical characterization of the oil of grape seeds

The following physic-chemical parameters were evaluated applying the methods recommended by AOAC (1980) and COVENIN (325:2001): relative density AOAC (28.004); refraction index AOAC (28.006); titratable acidity COVENIN (325:2001); saponification index AOAC (28.026); peroxide index AOAC (28.023) and iodine index AOAC (28.021).

Determination of the antibacterial activity of oil of grape seeds by the diffusion method in agar

Bacterial strains used

The antibacterial activity of grape seeds oil was studied with the bacterial strains *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25823, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 35218, which were provided by the Bacterial Reference Center of Hospital Universitario, Zulia state.

Activation and preparation of the inoculum

The bacterial strains were cultivated and kept in nutritive broth (HIMEDIA, India) and frozen at 4°C. The activation of the strain and preparation of the inoculum was done according to the indicated by Martínez *et al.* (2003) and Power and McCuen (1998), respectively, the oil of grape seeds was sterilized using the filtering process with a 0.22 µm millipore membrane, with the aim of guaranteeing the complete sterility of oil (Burt, 2004). According to the methodology described by Martínez *et al.* (2003), the following concentrations

a lo indicado por Martínez *et al.* (2003) y Power y McCuen (1998) respectivamente, el aceite de semillas de uva fue esterilizado mediante filtrado con membrana millipore de 0,22 μm con el fin de garantizar la completa esterilidad del aceite (Burt, 2004). De acuerdo a la metodología descrita por Martínez *et al.* (2003). Se prepararon las siguientes concentraciones del aceite de semillas de uva a 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90% empleando etanol como solvente de dilución (Riedel Haën, Alemania)

Actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva

Para la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite se empleó la técnica de difusión en agar propuesta por Burt (2004) con algunas modificaciones (Hammer *et al.*, 1999; NCCLS, 2000). Se inocularon 100 μL de cultivo bacteriano puro en placas que contenían 18 mL de agar nutritivo (Merck, Alemania). A cada una de las placas le fueron perforados tres orificios de 4 mm de diámetro dentro de los cuales se añadieron 100 mL de cada una de las concentraciones de aceite preparadas. Las placas fueron incubadas a 36°C durante 24 horas. Se realizaron controles de crecimiento bacteriano y de los solventes empleados para la preparación de las muestras (etanol) y para la extracción del aceite (hexano). La actividad antibacteriana se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada orificio, y se expresó en mm, considerando inhibitorio un valor ≥ 1 mm, Hammer *et al.* (1999).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite de semillas de uva

Se utilizó el método de dilución en caldo por triplicado (NCCLS, 2000). En

oil of grape seeds were prepared at 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90%, using ethanol as dilution solvent (Riedel Haën, Germany).

Antibacterial activity of grape seeds oil

For evaluating the antibacterial activity of the oil, the agar diffusion technique was used proposed by Burt (2004) with some modifications (Hammer *et al.*, 1999; NCCLS, 2000). 100 μL of pure bacterial culture were inoculated in plates containing 18 mL of nutritious agar (Merck, Germany). Three holes of 4mm of diameter were done to each plate, and 100 mL of each of the oil concentration prepared were added. The plates were incubated at 36°C for 24 hours. Controls of bacterial growth were performed as well as to the solvents used for preparing the samples (ethanol) and for extracting the oil (hexane). The antibacterial activity was determined measuring the inhibiting halo around each hole and was expressed in mm, considering inhibitory a value ≥ 1 mm, Hammer *et al.* (1999).

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of grape seeds oil

The broth dilution method was used by triplicate (NCCLS, 2000). In essay tubes with 9.8 mL of soy tripticase broth (Himedia, India), using a micro-pipette (Boeco 100 - 1000 μL) were added 100 μL of the different oil concentrations previously selected based on the results obtained in the antibacterial activity (6, 7, 8, 9 and 10%) for *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* and (36, 37, 38, 39 and 40%) for *B. subtilis*. One

tubos de ensayo con 9,8 mL de caldo tripticasa soya (Himedia, India), utilizando una micropipeta (Boeco 100-1000 μL) se agregaron 100 μL de las diferentes concentraciones del aceite seleccionadas previamente con base en los resultados obtenidos en la actividad antibacteriana (6, 7, 8, 9 y 10%) para *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* y (36, 37, 38, 39 y 40%) para *B. subtilis*. Se inocularon 100 μL de los microorganismos antes mencionados que resultaron ser sensibles en la prueba anterior, este inóculo fue estandarizado previamente por turbidimetría al 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) con solución salina estéril (0,85%). Luego se incubaron a 37°C durante 24 horas, se evaluó la inhibición y se determinó la concentración más baja a la cual el aceite inhibió el crecimiento microbiano por turbidimetría (Martínez *et al.*, 2003; Gómez, 2008).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 10 para Windows. Se aplicó la prueba de Duncan de comparaciones múltiples para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre los resultados obtenidos sobre el rendimiento de aceite de semillas de uva en función del tiempo de extracción.

Resultados y discusión

Optimización del tiempo de extracción

Los rendimientos obtenidos en la extracción del aceite a diferentes tiempos se muestran en el cuadro 1.

Los mayores rendimientos ($8,86\% \text{ m} \cdot \text{m}^{-1}$) se obtuvieron a las 5 y 7

hundred μL of the previously mentioned microorganisms that turned out to be sensitive in the previous test were inoculated, this inoculum was previously standardized by turbidimetry at 0.5 of the McFarland scale (approximately $1.5 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) with sterile saline solution (0.85%). Later, were incubated at 37°C for 24 hours, the inhibition was evaluated and the lowest concentration was determined in which the oil inhibits the microbial growth by turbidimetry (Martínez *et al.*, 2003; Gómez, 2008).

Statistical analysis

The statistical analysis was done using the SPSS program version 10 for Windows. Multiple comparisons Duncan test was applied for determining the existence or lack of existence of significant differences among the results obtained on the yield of grape seed oil in function of the extraction time.

Results and discussion

Optimization of the extracting time

The yields obtained in the extraction of oil at different times are shown on table 1.

The highest yields ($8.86\% \text{ m} \cdot \text{m}^{-1}$) were obtained at 5 and 7 hours, without observing significant differences ($\alpha=0.05$) among both times; this was the reason the time of 5 hours was selected for carrying out extractions since it represented the highest yield, and from the profitability point of view, it would reduce the production cost. The results obtained differed from those reported by other authors Rubio

Cuadro 1. Rendimiento del aceite de semillas de uva (*Vitis vinifera*) obtenidos a diferentes tiempos de extracción.

Table 1. Yield of grape seed oil (*Vitis vinifera*) obtained at different extracting time.

Tiempo de extracción (Horas)	Rendimiento (% m.m ⁻¹ ± DE) ¹
5	8,86±0,12 ^a
6	8,60±0,34 ^b
7	8,86±0,31 ^a

¹Los resultados fueron promedio de nueve mediciones.

^{a,b}Valores promedios con letras distintas (prueba de Duncan) fueron significativamente diferentes para $\alpha=0,05$.

horas no evidenciándose diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre ambos tiempos, por lo cual se seleccionó el tiempo de 5 horas para realizar las extracciones, debido a que presentó el más alto rendimiento y desde el punto de vista de rentabilidad disminuyó el costo de producción. Los resultados obtenidos difirieron de los reportados por otros autores Rubio *et al.* (2009) 15,10% m.m⁻¹; Pardo *et al.* (2008) 3,50% m.m⁻¹; Maier *et al.* (2009) 16% m.m⁻¹; Passos *et al.* (2009) 16,5% m.m⁻¹; Cao e Ito (2003) 6,20% m.m⁻¹. Las diferencias observadas podrían atribuirse a las diferentes técnicas de extracción empleadas en cada una de las investigaciones realizadas o al tamaño de las vacuolas que contenían el aceite de las semillas de uva en cada una de las variedades de uva.

Caracterización fisicoquímica del aceite de semillas de uvas

Los valores obtenidos en el análisis fisico-químico del aceite extraído se compararon con los establecidos en el Codex (2001), norma COVENIN (30:1992) y con los reportados por Molero *et al.* (1996) y Pardo *et al.*

et al. (2009) 15.10% m.m⁻¹; Pardo *et al.* (2008) 3.50% m.m⁻¹; Maier *et al.* (2009) 16% m.m⁻¹; Passos *et al.* (2009) 16.5% m.m⁻¹; Cao and Ito (2003) 6.20% m.m⁻¹. The differences observed might be attributed to different extraction techniques used on each of the researches carried out, or to the size of the vacuoles containing of the grape seed oil on each of the grape varieties.

Physic-chemical characterization of the grape seed oil

The values obtained in the physic-chemical analysis of the extracted oil were compared to those established in the Codex (2001), COVENIN norm (30:1992) and to those reported by Molero *et al.* (1996) and Pardo *et al.* (2008). In table 2 are presented the evaluation results of the chemical properties of the grape seed oil.

The value of titratable acidity obtained (1.32 g of oleic acid.100 g⁻¹ of oil) expressed as percentage of oleic acid was on the limits established by the Venezuelan norm COVENIN (30:1992) for eatable vegetable oils, which in the case of raw oils admits as maximum value 2% of oleic acidity;

(2008). El cuadro 2 muestra los resultados de la evaluación de las propiedades químicas del aceite de semillas de uva.

El valor obtenido de acidez titulable (1,32 g de ácido oleico.100 g⁻¹ de aceite), expresado como porcentaje de ácido oleico, estuvo dentro de los límites establecidos por la normativa venezolana COVENIN (30:1992) para aceites vegetales comestibles, que en el caso de aceites crudos admite como valor máximo 2% de acidez oleica; aunque el valor obtenido en esta investigación fue similar al reportado por Pardo *et al.* (2008) para cuatro variedades de uva (Monastrell, Garnacha Tintorera, Petit Verdot y Syrah) que fue desde 0,82 hasta 1,47%.

El índice de yodo obtenido en el aceite de semillas de uva, fue superior (153,54 cgI₂.g⁻¹) a los valores considerados por Molero *et al.* (1996) 124,00 cgI₂.g⁻¹, lo cual sugiere una importante proporción de ácidos grasos insaturados. Esta característica se relacionó con el alto valor del índice de

even though, the value obtained reported in the current research was similar to the one mentioned by Pardo *et al.* (2008) for four varieties of grapes (Monastrell, Garnacha Tintorera, Petit Verdot and Syrah) that goes from 0.82% to 1.47%.

The iodine index obtained in the grape seed oil is superior (153.54 cgI₂.g⁻¹) to the values considered by Molero *et al.* (1996) 124.00 cgI₂.g⁻¹, which suggests an important proportion of unsaturated fatty acids. This characteristic was related to a high value of peroxides (112.7 meq O₂.kg⁻¹), which could have been favored by factors such as the drying conditions, storing time of the oil and preliminary operations of the extraction (Molero *et al.*, 1996).

The saponification index of the extracted oil is lower (245.7 mg KOH.g⁻¹) to the one obtained by Molero *et al.* (1996), 289.00 mg KOH.g⁻¹, which was an indicator of the chain longitude. This characteristic of the oil obtained makes it attractive for the fabrication of soaps.

Cuadro 2. Caracterización físico-química del aceite de semillas de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malvasía.

Table 2. Physic-chemical characterization of grape seed oil (*Vitis vinifera*) Malvasía variety.

VARIABLES	Valor ± (DE) ^a
Acidez titulable (% ácido oleico)	1,32±0,00
Índice de peróxidos (meq O ₂ .kg ⁻¹)	112,70±0,01
Índice de saponificación (mg KOH.g ⁻¹)	245,70±0,02
Índice de yodo (cgI ₂ .g ⁻¹)	153,54±0,45
Índice de refracción (a 25°C)	1,4660±0,00
Densidad relativa (g.mL ⁻¹)	0,8523±0,00

^aAnálisis realizado por triplicado.

peróxidos (112,7 meq O₂.kg⁻¹), lo cual pudo favorecerse por factores como condiciones de secado, tiempo de almacenamiento del aceite y operaciones preliminares de la extracción (Molero *et al.*, 1996).

El índice de saponificación del aceite extraído fue menor (245,7 mg KOH.g⁻¹), al obtenido por Molero *et al.* (1996), 289,00 mg KOH.g⁻¹, lo cual fue un indicio de la longitud de la cadena. Esta característica del aceite obtenido, lo hace muy apreciable para la fabricación de jabones.

Los valores obtenidos de las propiedades físicas, índice de refracción y densidad relativa, estuvieron dentro de los valores reportados para los aceites de este tipo según el Codex (2001) y similares a los reportados por Molero *et al.* (1996).

Actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva

El cuadro 3 muestra la actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva (*V. vinifera*) variedad Malvasía.

Las cepas bacterianas Gram⁺; *B. cereus* y *S. aureus*, presentaron halos de inhibición entre 4 y 7 mm de diámetro correspondiendo a las concentraciones de 90 y 100% siendo éstas las de mayor efecto inhibitorio. Para las concentraciones de 80, 70, 60 y 50% el diámetro de los halos fue de 3-4 mm. Los halos de inhibición para las concentraciones menores de 50% fueron de 2 y 3 mm. La bacteria Gram⁺ *B. subtilis*, presentó los halos de inhibición de mayor tamaño con valores en el rango de 3-10 mm de diámetro para las concentraciones de 90 y 100%; no obstante, no se observó actividad a las concentraciones por debajo de 40%.

The values obtained of the physical properties; refraction index and relative density were on the values reported for the oils of this type according to Codex (2001) and similar to the reported by Molero *et al.* (1996).

Antibacterial activity of grape seed oil

Table 3 shows the antibacterial activity of grape seed oil (*V. vinifera*) Malvasía variety.

Gram⁺ bacterial strains; *B. cereus* and *S. aureus*, presented inhibition halos from 4 to 7 mm of diameter corresponding to the concentrations of 90 and 100%, being these the ones of higher inhibitory effect. For the concentrations of 80, 70, 60 and 50% the diameter of the halos was of 3-4 mm. The inhibition halos for the concentrations lower to 50% were of 2 and 3 mm. Gram⁺ bacteria *B. subtilis*, presented the biggest inhibitory halos with rank values from 3-10 mm of diameter for the concentrations of 90 and 100%; nevertheless, none activity was observed to the concentrations under 40%.

All the bacteria essayed were resistant to the concentration of 1%. It was important to mention that the size of the halo presented was the result of the difference of the total halo and the size of the well of 4 mm.

Göktürk *et al.* (2004) analyzed the antibacterial activity of grape seed extracts (*V. vinifera*) at concentrations from 1 to 20% on the bacteria *B. cereus* FMC19, *B. subtilis* IMG22, *E. coli* DM, *P. aeruginosa* ATCC27853 and *S. aureus* COWAN, the highest sensitivity for all the bacteria was

Cuadro 3. Actividad antibacteriana del aceite de semillas de uva (*Vitis vinifera*) variedad Malvasía.Table 3. Antibacterial variety of grape seed oil (*Vitis vinifera*) Malvasía variety.

Microorganismo	Concentración del aceite										
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>E. coli</i>	0	3	3	3	3	25	25	25	25	25	25
<i>P. aeruginosa</i>	0	5	5	6	7	8	8	8	9	10	10
<i>S. aureus</i>	0	2	2	2	2	3	3	4	4	6	7
<i>B. cereus</i>	0	3	3	3	3	3	3	3	3	4	5
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	3	7	7	8	9	10	10

*Resultado de cinco réplicas

Todas las bacterias ensayadas fueron resistentes a la concentración del 1%. Es importante mencionar que el tamaño de halo presentado fue el resultado de la diferencia del halo total menos el tamaño del pozo que fue de 4 mm.

Göktürk *et al.* (2004) analizaron la actividad antibacteriana de extractos de semillas de uva (*V. vinifera*) a concentraciones entre 1 y 20%, sobre las bacterias *B. cereus* FMC19, *B. subtilis* IMG22, *E. coli* DM, *P. aeruginosa* ATCC27853 y *S. aureus* COWAN, la mayor susceptibilidad para todas las bacterias se observó a la concentración del 20%; sin embargo, en el presente estudio para la misma concentración, solo las bacterias *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, fueron susceptibles al aceite de semillas de uva. Con respecto a la concentración del 1% de aceite de semillas de uva, todas las bacterias fueron resistentes, un comportamiento similar fue observado en el presente estudio.

Mahmud *et al.* (2009) evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial puro de *Citrus acida* var. sour lime frente a las bacterias: *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, resultando susceptibles *B. subtilis* > *B. cereus* > *S. aureus*, al comparar los resultados obtenidos con el aceite de semillas de uva a concentraciones del 100%, resultó el orden de susceptibilidad *B. subtilis* > *S. aureus* > *B. cereus*. Así mismo, los resultados de este estudio difirieron de los reportados por Gilles *et al.* (2010) para aceites de eucalipto, quienes obtuvieron halos de inhibición de 90, 15,8 y 7,7 mm frente a las bacterias *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Las diferencias encontradas podrían

observarse a concentración de 20%; however, in the current research for the same concentration only the bacteria *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, were sensitive to the grape seed oil. Regarding the concentration at 1% of grape seed oil, all the bacteria were resistant, a similar behavior was observed in the current research.

Mahmud *et al.* (2009) evaluated the antibacterial activity of the pure essential oil of *Citrus acida* var. sour lime with the bacteria: *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, being sensitive to *B. subtilis* > *B. cereus* > *S. aureus*, and when comparing the results obtained to the grape seed oil at concentrations of 100% the sensitivity order was *B. subtilis* > *S. aureus* > *B. cereus*. Likewise, the results of the current research differ from those reported by Gilles *et al.* (2010) for oils of eucalyptus, who report inhibition halos of 90, 15.8 and 7.7 mm with the bacteria *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively.

The differences found might be attributed to the chemical composition of oils, especially to the presence of terpene compounds with high antibacterial power such as piperitone in the essential oils of eucalyptus. Likewise, the variations among the strains and the assay conditions should be considered, such as: volume of the inoculum, culture media, pH of the media, depth, time, incubation time and diffusion of the oil.

The inhibition halos for the Gram⁻ bacteria *P. aeruginosa* were from 5 to 10 mm, corresponding to the highest measure of the halo diameter (10 mm) for the concentrations of 90 and 100%.

estar atribuidas a la composición química de los aceites, principalmente a la presencia de compuestos terpénicos con alto poder antibacteriano como la piperitona en los aceites esenciales de eucalipto. Se debe considerar de igual forma, las variaciones entre las cepas y las condiciones de los ensayos como, volumen del inóculo, medio de cultivo, pH del medio, profundidad del medio, tiempo, temperatura de incubación y difusión del aceite.

Los halos de inhibición para la bacteria Gram⁻ *P. aeruginosa*, fueron de 5 y 10 mm correspondiendo la mayor medida del diámetro del halo (10 mm) para las concentraciones de 90 y 100%. A las concentraciones de 80, 70, 60 y 50%, el diámetro de los halos se encontraban entre 8 y 9 mm, mientras que para las concentraciones más bajas los halos fueron de 5 y 7 mm, no se observó inhibición al 1%. Para la bacteria Gram⁻ *E. coli* los halos de inhibición estuvieron entre 3 a 25 mm para las concentraciones entre 50-100%, siendo la mayor medida correspondiente a la concentración del 100%. A concentraciones menores a 50% los halos fueron de 3 mm, observándose que al 1% no se presentó inhibición alguna, por lo que se podría inferir que a mayor concentración de aceite de semillas de uva, mayor fue el efecto de inhibición para todas las cepas ensayadas tanto Gram⁻ como Gram⁺.

El aceite esencial obtenido de hierbas aromáticas como *Zingiber mimmonii*, presentó actividad ante las bacterias *P. aeruginosa* y *E. coli* con halos de inhibición de 8 y 7,7 mm respectivamente, con una concentración entre 50-70%, resultando similar a los obtenidos en este estudio para *P. aeruginosa* (8 mm) y menor para *E.*

To concentrations of 80, 70, 60 and 50%, the diameter of halos was from 8 to 9 mm; meanwhile, for the lowest concentrations the halos were from 5 to 7 mm; and inhibition was not observed at 1%. For the Gram⁻ bacteria *E. coli* the inhibition halos were from 3 to 25 mm for the concentrations from 50-100%; being the highest measure the one corresponding to the concentration at 100%. Concentrations lower than 50% had halos of 3 mm, observing that at 1% none inhibition was observed; thus, it can be inferred that at a higher concentration of grape seed oil, higher was the inhibition effect for all the essayed strains of both positive and Gram⁻.

The essential oil obtained of aromatic herbs such as *Zingiber mimmonii*, presented activity to the bacteria *P. aeruginosa* and *E. coli* with inhibition halos from 8 to 7.7 mm respectively, with a concentration from 50-70%, resulting similar to the ones obtained in the current research for *P. aeruginosa* (8 mm) and lower to *E. coli* (25 mm). The grape seed oil employed in the current research presented higher antibacterial activity on the Gram⁻ bacteria *E. coli*.

Irfan *et al.* (2010), reported the antibacterial activity that presented the essential oil of lemon (*Cymbopogon citratus*) to the strains: *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *P. aeruginosa*. The oil essayed had a high antibacterial potential against all the strains except to *P. aeruginosa* using concentrations from 10 to 30%; thus, it can be considered that the oil was more sensitive to Gram⁺ microorganisms than to Gram⁻, maybe by the difference

coli (25 mm). El aceite de semillas de uva empleado en este estudio presentó por tanto mayor actividad antibacteriana sobre la bacteria Gram⁻ *E. coli*.

Irfan *et al.* (2010), reportaron la actividad antibacteriana que presentó el aceite esencial de limón (*Cymbopogon citratus*) ante las cepas: *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa*. El aceite ensayado tuvo un alto potencial antibacteriano contra todas las cepas excepto *P. aeruginosa* utilizando concentraciones entre el 10 y 30%, por lo que podría atribuirse a que el aceite fue más susceptible a microorganismos Gram⁺ que Gram⁻, quizás por la diferencia que presentaron este tipo de bacterias en su estructura, debido a que las Gram⁻ poseen en su estructura una capa gruesa de peptidoglicano que pudiera inferir en la penetración del aceite, por otra parte los mecanismos de resistencia que presenta cada microorganismo también pudo interferir en la difusión del aceite ensayado. Los halos de inhibición reportados para las cepas descritas anteriormente oscilaron entre 7,66 y 29,66 mm exceptuando *P. aeruginosa* la cual fue resistente a todas las concentraciones de aceite ensayadas. Los valores indicados para esta investigación fueron similares a los reportados en este estudio; sin embargo, difirió en el efecto ante la cepa *P. aeruginosa*, debido a que el aceite de semillas de uva presentó halos de inhibición entre 5 y 10 mm.

La investigación realizada por Benavides *et al.* (2012), aportó una aplicación del uso de aceites esenciales en alimentos. Los autores diseñaron una película de alginato incorporándole

that these bacteria have in their structure, since Gram⁻ have in their structure a thick layer of peptidoglycan that might intervene in the penetration of oil; on the other hand, the resistance mechanisms present on each microorganisms might have also interfered in the diffusion of the oil assayed.

The inhibition halos reported for the strains previously described went from 7.66 to 29.66 mm, excepting *P. aeruginosa* which was resistant to all oil concentrations assayed. The values indicated in this research were similar to those reported in the current research; however, these differ in the effect to the strain *P. aeruginosa*, since the grape seed oil presented inhibition halos from 5 to 10 mm.

The research carried out by Benavides *et al.* (2012), provided a use application of essential oils in food. The authors designed an alginate film incorporating essential oregano oil, with the aim of covering different types of food for extending the useful life and making them more attractive to the market. The result was a high inhibitory power to the strains of *S. aureus* and *E. coli* with different diameters 22.19±0.05 and 21.89±0.12 mm respectively employing a minimal concentration of 1% of oil.

The grape seed oil obtained in the Zulian region has a mild antibacterial activity to the assayed strains, suggesting its evaluation to be employed in the elaboration of medicinal, food and beauty products.

Minimum inhibitory concentration (MIC) of grape seed oil

For the strains *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* a

aceite esencial de orégano, con la finalidad de recubrir diferentes tipos de alimentos para prolongar su vida útil y hacerlos más atractivos al mercado. El resultado fue un alto poder inhibitorio ante las cepas *S. aureus* y *E. coli* con diámetros de $22,19 \pm 0,05$ y $21,89 \pm 0,12$ mm respectivamente, empleando una concentración mínima de 1% del aceite.

El aceite de semillas de uva obtenido en la región zuliana posee una actividad antibacteriana moderada ante las cepas ensayadas por lo que se sugiere su evaluación para ser empleado en la elaboración de productos medicinales, alimenticios y cosmetológicos.

Concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite de semillas de uva

Para las cepas *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* se obtuvo una CIM de 10% debido a que por debajo de esta concentración las cepas no resultaron ser inhibidas. De igual manera, para *B. subtilis*, la CIM resultó ser de 40%.

González (2010) reportó una concentración inhibitoria mínima de los extractos de semillas de uva (*V. vinifera*) variedad tempranillo, para *E. coli* y *P. aeruginosa* de 6%, datos inferiores a los obtenidos en esta investigación resultando una CIM para las mismas cepas de una concentración del 10%. Probablemente esta diferencia se debió a la variedad debido a que podrían contener más componentes fenólicos, los cuales fueron los responsables mayoritarios de las propiedades antibacterianas (Consentino *et al.*, 1999).

Colivet (2006) determinó la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico de ají dulce (*Capsicum*

MIC of 10% was obtained, since under this concentration the strains were not inhibited. Likewise, for *B. subtilis*, the MIC resulted to be 40%.

González (2010) reported a minimum inhibitory concentration of the extracts of grape seed (*V. vinifera*) tempranillo variety, for *E. coli* and *P. aeruginosa* of 6%, lower data to the ones obtained in the current research; obtaining a MIC for the same strains of a 10% concentration. This difference might be due to the fact that these could have phenolic compounds, which are the main responsible of antibacterial properties (Consentino *et al.*, 1999).

Colivet (2006) determined the minimum inhibitory concentration of the ethanol extract of sweet pepper (*Capsicum chinense*) for *E. coli* resulting to be 25%; meanwhile, the reported in this research was of 10%, inferior percentage maybe due to the chemical composition of the oil, since the grape seed oil is rich in phenolic compounds to which have been attributed antibacterial properties (Burt, 2004).

Irfan *et al.* (2010), reported a MIC of 0.06% for *S. aureus*, *B. subtilis*, and *B. cereus* and 0.12% for *E. coli*, using essential oil of lemon (*C. citratus*). These values differ to the ones obtained in the current research for the same strains, which might be attributed to the chemical composition, fruity variety, geographic sources and even the extraction method (Consentino *et al.*, 1999).

The antibacterial activity obtained in the evaluated strains is relevant since these are responsible of important serious infections, and

chinense) para *E. coli* resultando ser de 25%, mientras que el reportado en este estudio fue de 10%, porcentaje inferior probablemente debido a la composición química del aceite debido a que el aceite de semillas de uva es rico en compuestos fenólicos, a los cuales se les ha atribuido propiedades antibacterianas (Burt, 2004).

Irfan *et al.* (2010), reportaron CIM de 0,06% para *S. aureus*, *B. subtilis*, y *B. cereus* y 0,12% para *E. coli*, utilizando aceite esencial de limón (*C. citratus*). Estos valores difirieron de los obtenidos en este estudio para las mismas cepas, lo cual podría atribuirse a la composición química, variedad frutal, cosecha, fuentes geográficas y hasta el método de extracción (Consentino *et al.*, 1999).

La actividad antibacteriana obtenida ante las cepas evaluadas, es relevante debido a que éstas son responsables de infecciones oportunistas graves y muy a menudo presentan resistencia a antibióticos convencionales. Al inhibir el crecimiento de patógenos y/o bacterias que causan deterioro, el aceite de semillas de uva, puede considerarse como un conservante natural para ser utilizado en la industria alimentaria para el control de enfermedades humanas y animales, de origen microbiano.

Conclusiones

La extracción Soxhlet, empleando n-hexano como solvente y cinco horas de extracción permitió obtener un alto rendimiento del aceite de semillas de uvas variedad Malvasía.

El aceite de semillas de uva presentó actividad antibacteriana para

commonly present resistant to conventional antibiotics. When inhibiting the pathogen growth and/or bacteria that cause deterioration, grape seed oil might be considered as a natural preserver to be used in the food industry for the control of human and animal diseases with microbial origin.

Conclusions

The Soxhlet extraction, employing n-hexane and five-extracting hours allowed obtaining a high yield of grape seed oil of the Malvasía variety. The grape seed oil presented antibacterial activity for all the bacteria assayed to concentrations of 90 and 100%.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was of 10% for *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, and for *B. subtilis* was of 40%.

Acknowledgement

The authors thank the Socialist Center of Research and Wine Development (CESID Viticola) for having supplied samples; also, to the Center of Bacteria Reference of Hospital Universitario de Maracaibo, Zulia state, by the provision of different bacterial strains used in the current research.

End of english version

todas las bacterias ensayadas a concentraciones de 90 y 100%.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue del 10% para *B. cereus*,

S. aureus, *P. aeruginosa* y *E. coli* mientras que para *B. subtilis* fue de 40%.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Vitivinícola (CESID Vitícola) por el suministro de las muestras y al Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia por la dotación de las diferentes cepas bacterianas utilizadas en la investigación.

Literatura citada

- Benavides, S., R. Villalobos and J. Reyes. 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering* 110: 232-239.
- Berradre, M., N. Arias, G. Ojeda de Rodríguez, B. Sulbarán, V. Fernández y J. Peña. 2014. Actividad antioxidante del aceite de semillas de uva *Vitis vinifera* de la Variedad Tempranillo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 31:393-406.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253.
- Camacho, B., I. López, D. García, M. González, M. Moreno-Álvarez y C. Medina. 2005. Evaluación fisicoquímica de la semilla y del aceite de corozo (*Acrocomia aculeata Jacq.*). *Grasas y aceites* 56:311-316.
- Cao, X. and Y. Ito. 2003. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 1021:117-124.
- Codex Alimentarius. Codex Standard for Named Vegetable Oils. 1999-2001. Codex Stan 210.
- Colivet, J., G. Beloso y E. Hurtado. 2006. Comparación del efecto inhibitor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* *Revista de la Universidad De Oriente, Núcleo de Monagas, Escuela de Zootecnia. Departamento de Biología y Sanidad Animal, Programa de Tecnología de Alimentos* 18(2):168-173.
- Cook, N. and S. Samman. 1996. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7:66-76.
- Consentino, S., C. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi and F. Palmas. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29:130-135.
- COVENIN 1980. Norma venezolana 1576. Toma de muestras. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela.
- COVENIN. 1992. Aceites y grasas, Norma N° 30: Aceites y grasas vegetales comestibles (Norma general). Comisión Venezolana de Normas Industriales, Ediciones Fondonorma, Caracas.
- FAOSTAT. 2007. FAO Statistical Database. Disponible en <http://www.fao.org>. Consultado en Julio de 2008.
- Figueroa-Espinoza, M., A. Zafimahoba, P. Maldonado, E. Dubreucq and C. Poncet-Legrand. 2015. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidants properties. *Food Chemistry* 178:38-44.
- Fiori, L. 2007. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids* 43:43-54.
- García, D., A. Matos, D. Belén y M. Moreno-Álvarez. 2003. Características fisicoquímicas y composición de ácidos grasos del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubis glaucus Benth*). *Grasas y aceites* 54:259-263.

- Gilles, M., J. Zhao, M. An and S. Agbool. 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry* 119:731-737.
- Göktürk, N., Ö. Gülcan and O. Sagdic. 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 15:335-339.
- Gómez, A. 2008. Caracterización de extractos y aceites esenciales. Evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de Piperaceas (*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. unbellatum*). Revista de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia 26-28.
- González, C. 2010. Estudio de la actividad antioxidante y antibacteriana en extracto de semillas de uva (*Vitis vinifera*) Variedad Malvasia y Tempranillo. Trabajo de Grado de Licenciatura en Química. Universidad Del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias. pp. 42-47.
- Guerra, E. y M. Zúñiga. 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinifera*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites* 54:53-57.
- Hammer, K., C. Carson and T. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal Appl. Microbiol.* 86:985-990.
- Irfan, M., B. Ahmad, E. Jaykumar and J. Ahmad. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some select pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 1:535-538.
- Lafka, T.I., V. Sinanoglou and E. Lazos. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry* 104: 1206-1214.
- Mahmud, S., M. Saleem, S. Siddique, R. Ahmed and Z. Perveen. 2009. Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus acida* var. sour lime peel oil. *Journal of Saudi Chemical Society* 13:195-198.
- Maier, T., A. Schieber, D. Kammerer and R. Carle. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 112:551-559.
- Martínez, J., B. Sulbarán, G. Ojeda, A. Ferrer y R. Nava. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 20:510-512.
- Molero, A., C. Pereyra and E. Martínez. 1996. Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal* 61:227-231.
- NCCLS. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-Fifth edition. NCCLS document M7-A5. [ISBN 1-56238-394- 9] NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898. USA.
- Pardo, J., E. Fernández, M. Rubio, A. Alvarruiz and G. Alonso. 2008. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *Europe Lipid Science Technology* 111:188-193.
- Passos, C., R. Silva, F. Da Silva, M. Coimbra and C. Silva. 2009. Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using a enzymatically pretreated seed. *Food Chemistry* 48:225-229.
- Power, D. and C. McCuen. 1998. Manual de BBI, Products and laboratory procedures. Sixth edition. Maryland. U.S.A. pp. 43-48.
- Rubio, M., M. Álvarez-Ortí, A. Alvarruíz, E. Fernandez and J. Pardo. 2009. Characterization of oil obtained from grape seeds collected during Berry development. *J. Agric. Food Chem* 57:2812-2815.