

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Nutrición y Bromatología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**TESIS DOCTORAL**

**PARÁMETROS DE CALIDAD Y  
COMPONENTES CON INTERÉS NUTRICIONAL  
DEL ACEITE DE ARGÁN (*Argania spinosa*)**

Rocío Marfil Navarro  
2008





**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Nutrición y Bromatología  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**

TESIS DOCTORAL

**PARÁMETROS DE CALIDAD Y  
COMPONENTES CON INTERÉS NUTRICIONAL  
DEL ACEITE DE ARGÁN (*Argania spinosa*)**

Presentada por la Lda. Rocío Marfil Navarro  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada

Fdo.: Rocío Marfil Navarro

VºBº  
Los Directores de la Tesis

Profa. Dra. Carmen Cabrera Vique

Prof. Dr. Rafael Giménez Martínez

Dra. Olga Martínez Agustín

Granada mayo 2008





**Departamento de Nutrición y Bromatología**

**CARMEN CABRERA VIQUE, PROFESORA TITULAR DE  
UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y  
BROMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**INFORMA**

**Que la Tesis Doctoral titulada “Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*)”, de la que es autora D<sup>a</sup>. Rocío Marfil Navarro, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento, y a mi juicio, reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada, por la interesada, para optar al grado de Doctora.**

**Granada a 14 de mayo de 2008**





**Departamento de Nutrición y Bromatología**

**RAFAEL GIMÉNEZ MARTÍNEZ, PROFESOR TITULAR DE  
UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y  
BROMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**INFORMA**

**Que la Tesis Doctoral titulada “Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*)”, de la que es autora D<sup>a</sup>. Rocío Marfil Navarro, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento, y a mi juicio, reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada, por la interesada, para optar al grado de Doctora.**

**Granada a 14 de mayo de 2008**







**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**

**OLGA MARTÍNEZ AUGUSTÍN, DOCTORA EN FARMACIA, PROFESOR  
CONTRATADO DOCTOR TIPO 2 DEL DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II DE LA UNIVERSIDAD DE  
GRANADA**

**INFORMA**

**Que la Tesis Doctoral titulada “Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*)”, de la que es autora D<sup>a</sup>. Rocío Marfil Navarro, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento, y a mi juicio, reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada, por la interesada, para optar al grado de Doctora.**

**Granada a 14 de mayo de 2008**





**Departamento de Nutrición y Bromatología**

**M<sup>a</sup> DOLORES RUIZ LÓPEZ, PROFESORA TITULAR Y DIRECTORA DEL  
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**CERTIFICA**

**Que la Tesis Doctoral titulada “Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*)”, de la que es autora D<sup>a</sup>. Rocío Marfil Navarro, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.**

**Granada a 14 de mayo de 2008**



---

La presente Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en los Dptos. de Nutrición y Bromatología y Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Parte del estudio experimental, concretamente la determinación de tocoferoles y ceras, se ha llevado a cabo en el Laboratorio Agroalimentario de Atarfe, Granada, dependiente de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, dirigido por D. José Manuel Pozuelo García.

El estudio estadístico de los resultados ha sido realizado bajo la coordinación de la Dra. Paula Bouzas Rodríguez, profesora del Dpto. de Estadística e Investigación Operativa de la Universidad de Granada.



---

De esta Memoria de Tesis Doctoral, hasta la fecha se han efectuado las siguientes comunicaciones y publicaciones:

1. Estudio sobre los criterios de calidad del aceite de argán (*Argania spinosa*). III Jornadas "Actualización en Alimentación y Salud". Murcia 20 - 21 octubre, 2005.
2. Composición en ácidos grasos y polifenoles totales del aceite de argan (*argania spinosa*). III Jornadas "Actualización en Alimentación y Salud". Murcia 20 - 21 octubre, 2005.
3. Posibles efectos saludables del consumo de aceite de argán (*Argania spinosa*). III Jornadas Nacionales y I Internacionales de Ciencias de la Salud. Granada 11 - 13 mayo, 2006.
4. Aceite de argán (*argania spinosa*): obtención y criterios de calidad. IV Congreso de Ingeniería y Tecnología de los Alimentos. CESIA 2006. Córdoba 8 - 10 noviembre, 2006.
5. Influencia del método de extracción en el contenido metálico del aceite de argán virgen (*Argania spinosa*). II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. Murcia 28/29 febrero - 1 marzo, 2008.
6. Metal content and physico-chemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: influence of the extraction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008 [aceptado condicionalmente a las modificaciones propuestas por los revisores].





*A José Antonio, Rocío y Lucía*



# AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido y han hecho posible el desarrollo de este trabajo. Como no quiero dejar a nadie atrás, os doy las gracias de corazón a todos.

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Departamento de Nutrición y Bromatología y al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II por el cálido acogimiento que me han brindado y por hacer posible con su apoyo técnico y humano la consecución de este trabajo.

A la Profesora Dra. Carmen Cabrera Vique, que con su paciencia, cariño y ganas de trabajar, ha hecho posible la consecución de este trabajo. Me gustaría agradecerle la amistad y confianza que me has demostrado durante estos años, eres una persona excelente y muy humana. Hay pocas personas como tú, gracias por todo.

Al Profesor Dr. Rafael Giménez Martínez, por haberme ayudado con el estudio de los ácidos grasos y con la puesta a punto de las técnicas para la determinación de la capacidad antioxidante total, que tantos quebraderos de cabeza nos han dado y que sin duda alguna, no podría haber hecho sola. Gracias por tu paciencia, por tener siempre una sonrisa y una palabra de ánimo.

A la Profesora Dra. Olga Martínez Augustín, que desde el primer momento se ha interesado por esta Tesis y que gracias a la aportación de su trabajo la ha enriquecido enormemente. Muchas gracias también por tu amistad y cariño.

A la Profesora Dra. Paula Rodríguez-Bouzas, por su paciencia con todas mis consultas y por sus inestimables consejos en estadística. Me has ayudado mucho.

A la Profesora Dra. M<sup>a</sup> Dolores Ruiz López, por su ayuda e interés en mi trabajo.

Al Doctor José Ángel Rufián Henares, por su ayuda en el estudio de la capacidad antioxidante. Te agradezco mucho tu apoyo y colaboración.

Al Director del Laboratorio Agroalimentario de Atarfe, D. José Manuel Pozuelo García, a Andrea Mora, a José Antonio, a Paco, a María y resto de compañeros, por hacer posible la determinación de los tocoferoles y ceras. Muchas gracias por vuestra ayuda.

A Saloua, Abderrahman y otros alumnos anónimos del Departamento de Nutrición y Bromatología que han traído desde Marruecos todas las muestras de aceite de argán que han sido estudiadas en este trabajo. Muchas gracias a todos, ya que sin vuestra colaboración no habría sido posible.

A Alí y Quique, por la información aportada gracias al buen conocimiento del tema y colaboración en el estudio de la influencia del aceite de argán en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

A mi familia, padres, hermano, abuelas, suegros y cuñados, por su apoyo e interés en mi trabajo y por confiar en mí.

A mis dos niñas, Rocío y Lucía, a las que he tenido que robar mucho tiempo de juegos y paseos para poder terminar este trabajo del que espero que os sintáis orgullosas cuando seáis mayores. Os quiero mucho. Sois lo más importante para mí.

En especial, gracias a tí, José Antonio, por ser mi compañero, amigo, confidente, por aconsejarme y guiarme, por tu crítica constructiva y por ayudarme con las niñas. Por estar siempre ahí.

Muchas gracias a todos

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,  
sino como una oportunidad para penetrar en el  
bello y maravilloso mundo del saber”*

**Albert Einstein**



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	7
<b>III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
<b>1. Origen geográfico y características del argán</b> .....	13
<b>2. Métodos de obtención del aceite de argán</b> .....	17
2.1. Método tradicional o artesanal .....	17
2.2. Método de extracción parcialmente mecanizado o semi-industrial .....	21
2.3. Método de extracción por disolventes .....	23
<b>3. Composición química del aceite de argán</b> .....	26
3.1. Fracción saponificable .....	26
3.1.1. Ácidos grasos.....	26
3.1.2. Triacilglicéridos .....	28
3.2. Fracción insaponificable .....	29
3.2.1. Esteroles.....	31
3.2.2. Alcoholes triterpénicos.....	31
3.2.3. Hidrocarburos.....	32
3.2.4. Minerales y elementos traza .....	32
3.2.5. Ésteres no glicéridos: ceras.....	36
3.2.6. Antioxidantes: compuestos fenólicos y tocoferoles. Capacidad antioxidante total.....	37
<b>4. Interés nutricional y terapéutico del aceite de argán. Otros usos</b> .....	52
<b>5. Ácidos grasos y tocoferoles como agentes antiinflamatorios     intestinales</b> .....	57
5.1. Enfermedad inflamatoria intestinal.....	57
5.1.1. Epidemiología.....	57
5.1.2. Etiología.....	58
5.1.3. Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal .....	60
5.1.4. Modelos animales inducidos de colitis experimental .....	61
5.2. Ácidos grasos de la dieta, tocoferoles y enfermedad inflamatoria intestinal .....	64
5.2.1. Ácidos grasos.....	64
5.2.2. Tocoferoles .....	67



<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	69
<b>1. Toma y acondicionamiento de muestras</b> .....	71
<b>2. Determinación de parámetros de calidad</b> .....	74
2.1. Grado de acidez.....	74
2.2. Índice de peróxidos .....	76
2.3. Absorbancia en el ultravioleta ( $K_{232}$ y $K_{270}$ ). .....	78
2.4. Humedad e impurezas volátiles .....	80
2.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo.....	81
<b>3. Determinación de minerales y elementos traza: Cu, Fe, Cr, Mn y Pb</b> .....	84
<b>4. Determinación del perfil en ácidos grasos</b> .....	97
<b>5. Determinación del índice de refracción</b> .....	99
<b>6. Determinación de ceras</b> .....	100
<b>7. Estudio del contenido de antioxidantes</b> .....	104
7.1. Polifenoles totales .....	104
7.2. Tocoferoles.....	105
7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante total del aceite de argán.....	109
7.3.1. Método ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)}.....	111
7.3.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) .....	116
7.3.3. Método FRAP.....	118
<b>8. Inducción de la colitis y determinación del daño colónico</b> .....	121
<b>9. Diseño del estudio estadístico</b> .....	127
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	129
<b>1. Parámetros de calidad del aceite de argán</b> .....	132
1.1. Grado de acidez.....	134
1.2. Índice de peróxidos.....	135
1.3. Coeficientes de extinción al ultravioleta ( $K_{270}$ y $K_{232}$ ).....	136
1.4. Humedad e impurezas volátiles .....	137
1.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo.....	138
<b>2. Minerales y elementos traza</b> .....	140
2.1. Cobre.....	142
2.2. Hierro.....	145
2.3. Cromo .....	147
2.4. Manganeso .....	149
2.5. Plomo.....	151
<b>3. Perfil de ácidos grasos</b> .....	154

<b>4. Índice de refracción .....</b>	<b>163</b>
<b>5. Contenido en ceras.....</b>	<b>164</b>
<b>6. Estudio del contenido de antioxidantes en el aceite de argán.....</b>	<b>167</b>
6.1. Polifenoles totales.....	167
6.2. Tocoferoles .....	170
6.3. Evaluación de la capacidad antioxidante total del aceite de argán .....	175
6.3.1. Método ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)} .....	177
6.3.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) .....	180
6.3.3. Método FRAP .....	182
<b>7. Efecto de la administración de aceite de argán en un modelo experimental de colitis <i>in vivo</i> .....</b>	<b>184</b>
7.1. Modelo del TNBS.....	184
7.2. Efecto antiinflamatorio a nivel intestinal de la administración de aceite de argán virgen en la dieta de ratas, en comparación con la administración de aceites de oliva virgen y girasol.....	190
 <b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	 <b>195</b>
 <b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>199</b>



# ABREVIATURAS

- **ABTS:** Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico).
- **ABTS••:** Radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico).
- **AGS:** Ácidos grasos saturados.
- **AGMI:** Ácidos grasos monoinsaturados.
- **AGPI:** Ácidos grasos poliinsaturados.
- **AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos.
- **AP:** Actividad fosfatasa alcalina.
- **APCs:** Células presentadoras de antígenos.
- **BSA:** Albúmina sérica bovina.
- **BTHQ:** Butilhidroquinona.
- **CD4+:** Linfocitos T4.
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2.
- **CU:** Colitis ulcerosa.
- **DHA:** Ácido docosahexaenoico.
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
- **DPPH•:** Radical del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
- **DSS:** Sulfato sódico de dextrano.
- **EC:** Enfermedad de Crohn.
- **EII:** Enfermedad inflamatoria intestinal.
- **EPA:** Ácido eicosapentaenoico.
- **ERO:** Especies reactivas de oxígeno.
- **ERN:** Especies reactivas de nitrógeno.
- **ETA-AAS:** Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica.
- **FoxP3:** Forkhead box P3.
- **FRAP:** Capacidad de reducción férrica del plasma.
- **$\gamma$ -CEHC:** 2,7,8-trimetil-2-( $\gamma$ -carboxietil)-6-hidroxicromano.
- **HDL:** Lipoproteínas de alta densidad.
- **HTAB:** Bromuro de hexadecil trimetilamonio.
- **ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular – 1.

- **IFN $\gamma$** : Interferón gamma.
- **IL**: Interleuquina.
- **IL-1 $\beta$** : Interleuquina 1 $\beta$ .
- **IL-1ra**: Receptor antagonista de interleuquina 1.
- **iNOS**: Óxido nítrico sintetasa inducible.
- **IP**: Índice de peróxidos.
- **LD**: Límite de detección.
- **LDL**: Lipoproteínas de baja densidad.
- **LTB4**: Leucotrieno B4.
- **MIBK**: Metilisobutilcetona.
- **MPO**: Actividad mieloperoxidasa colónica.
- **NF $\kappa$ B**: Factor nuclear Kappa B.
- **NO $\bullet$** : Óxido nítrico.
- **NO $_2\bullet$** : Dióxido nítrico.
- **NOD-2**: Nucleotide oligomerization domain.
- **O $_2\bullet$** : Radical libre superóxido.
- **OH $\bullet$** : Radical libre hidroxilo.
- **ORAC**: Capacidad de absorbanza del radical oxígeno.
- **PAF**: Factor activador de plaquetas.
- **PG**: Prostaglandina.
- **PGE2**: Prostaglandina E2.
- **PPAR- $\gamma$** : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas- $\gamma$ .
- **PVDF**: Polifluoruro de vinilideno.
- **RF**: Factor de resolución.
- **RNA**: Ácido ribonucleico.
- **RT-PCR**: Transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa.
- **SAZ**: Sulfasalazina.
- **SDS-PAGE**: Electroforesis en gel de poliacrilamida – duodecilsulfato de sodio.
- **SOD**: Superóxido dismutasa.
- **TAA**: Actividad antioxidante total.
- **TEAC**: Capacidad antioxidante equivalente al Trolox.
- **TFF3**: Trefoil factor 3.
- **TGF- $\beta$ 2**: Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 2.
- **Th0**: Linfocitos T vírgenes “naive”.

- **Th1:** Células T colaboradoras (helper) tipo 1.
- **Th2:** Células T colaboradoras (helper) tipo 2.
- **TLRs:** Toll like receptors.
- **TNBS:** Ácido trinitrobenzenosulfónico.
- **TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .
- **TPTZ:** Complejo tripiridiltriazina.
- **TRAP:** Total radical-trapping antioxidant parameter.
- **TROLOX:** Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromato-2-carboxílico.
- **TXA2:** Tromboxano.
- **VCAM-1:** Molécula 1 de adhesión de células vasculares.
- **VLDL:** Lipoproteínas de densidad muy baja.







# I. INTRODUCCIÓN





El árbol del argán (*Argania spinosa*) se encuentra en el suroeste de Marruecos, en la vega de Souss, al pie de las montañas del Alto Atlas oriental y del Anti Atlas (Seidemann, 1998). Etimológicamente, la palabra argán procede del bereber “arjân” y significa “permanecer encerrado”; en efecto, el argán es autóctono de Marruecos (Khallouki *et al.* 2005). Su crecimiento está adaptado a medioambientes áridos, siendo capaz de sobrevivir en condiciones de sequía extrema y suelos pobres.

El fruto tiene un exterior verde y carnoso, que contiene un hueso de cáscara dura, con dos o tres semillas en su interior, de donde se obtiene el aceite (**Figura 1**), que es con diferencia, el producto obtenido del argán con mayor interés económico e industrial. Marruecos produce anualmente unas 4.000 toneladas del fruto de argán, de las que se obtienen entre 1.000 a 2.000 toneladas de aceite, cuyo precio en el mercado puede alcanzar en origen hasta 96 € el litro, siendo considerado el más caro del mundo. Los principales países importadores de este producto son Francia, Reino Unido, Alemania, Italia, España, Portugal, Bélgica, Holanda, Canadá, Estados Unidos y Japón, si bien la mayor parte se destina a consumo en el propio país (Chaussod *et al.* 2005).

El aceite de argán es un aceite virgen muy peculiar pues no se somete al proceso de refinado aplicado a la mayoría de los aceites de semillas. Los métodos de obtención son muy dispares y abarcan desde el método tradicional realizado de forma manual con o sin tostado de las semillas, hasta métodos semi-industrializados. Esto da lugar a variaciones importantes en las características fisicoquímicas del aceite y en sus componentes minoritarios con función biológica (Hilali *et al.* 2005).

En su composición destaca un elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y poliinsaturados (siendo el ácido linoleico el mayoritario) (Ray *et al.* 2004). Es rico en fitoesteroles, tocoferoles y polifenoles, además de otros componentes de la fracción insaponificable con actividad biológica. Estos compuestos derivan en un alto potencial antioxidante y en efectos beneficiosos para la salud.



**Figura 1.** Fruto fresco en el árbol, fruto desecado, hueso, semillas y aceite de argán.

Además de la aplicación obvia de este aceite en la alimentación humana, hay estudios que se han interesado por su uso como cosmético y como agente terapéutico. De hecho, se ha convertido en un verdadero “boom publicitario” como ingrediente en la fabricación de cosméticos (Khallouki *et al.* 2003).

La mayoría de los estudios científicos realizados con el aceite de argán se han orientado a determinar su efecto sobre la enfermedad cardiovascular, al disminuir la presión sanguínea y mejorar la función endotelial (Berrougui *et al.* 2003). Además, disminuye la concentración de colesterol y triacilglicéridos en sangre (Berrada *et al.* 2000; Berrougui *et al.* 2003; Drissi *et al.* 2004; Cherki *et al.* 2005; Derouiche *et al.* 2005; Berrougui *et al.* 2005; Berrougui *et al.* 2006). Otro de los principales efectos del aceite de argán es su efecto antiproliferativo celular que ha sido atribuido a los tocoferoles y a los antioxidantes fenólicos (Khallouki *et al.* 2003; Benzaira *et al.* 2006; Drissi *et al.* 2006; Samane *et al.* 2006).

El árbol del argán, perfectamente adaptado a su medioambiente, es una especie de gran interés ecológico, que contribuye al desarrollo socioeconómico de la región. Las raíces facilitan la infiltración del agua, protegiendo a los suelos de la erosión y reabasteciendo los acuíferos. Además, proporciona un gran número de productos aparte del aceite, como son forraje, carbón vegetal, materiales de construcción y combustible, ayudando a la subsistencia de 2 millones de personas en el Marruecos rural (Figura 2). Sin embargo, en las últimas décadas millones de árboles han sido destruidos sin control y no se han reemplazado. Esto ha derivado en diversos estudios dirigidos a evaluar nuevos métodos para incrementar la regeneración natural y/o artificial de esta planta, por ejemplo, selección genética, clonación *in vitro*, etc. (Bousselmame *et al.* 2001).

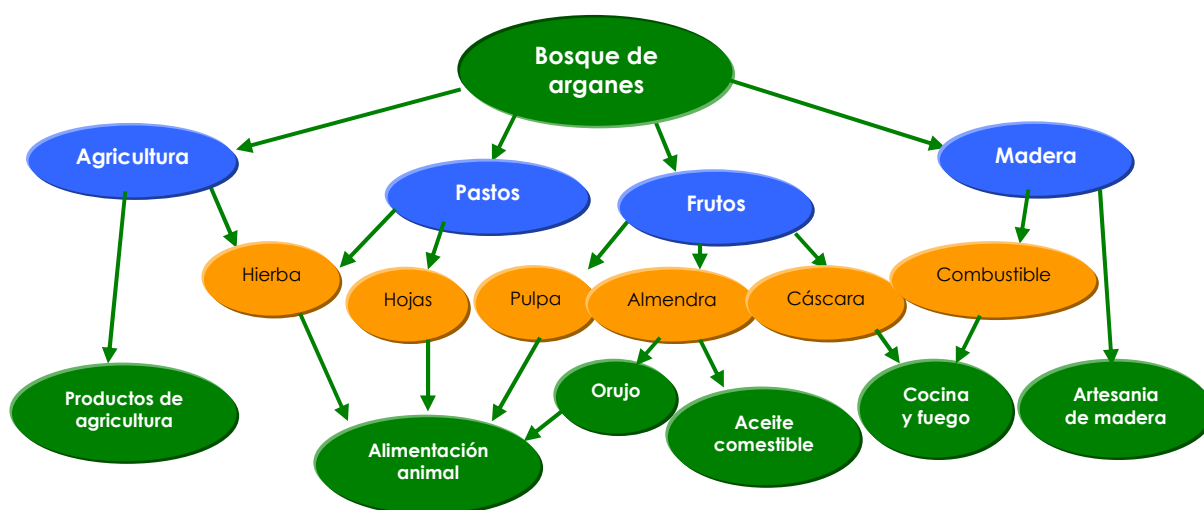
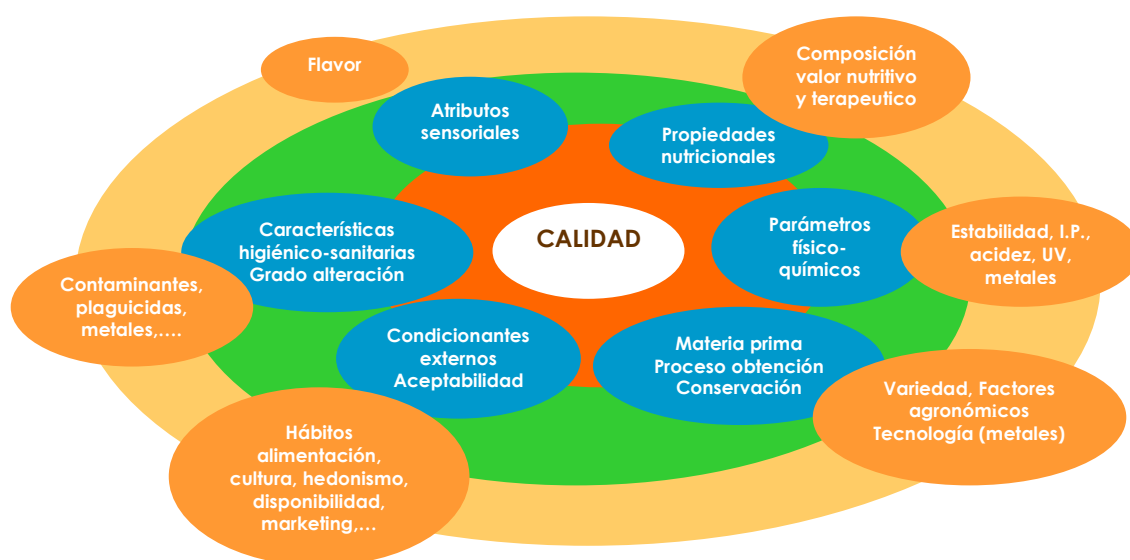


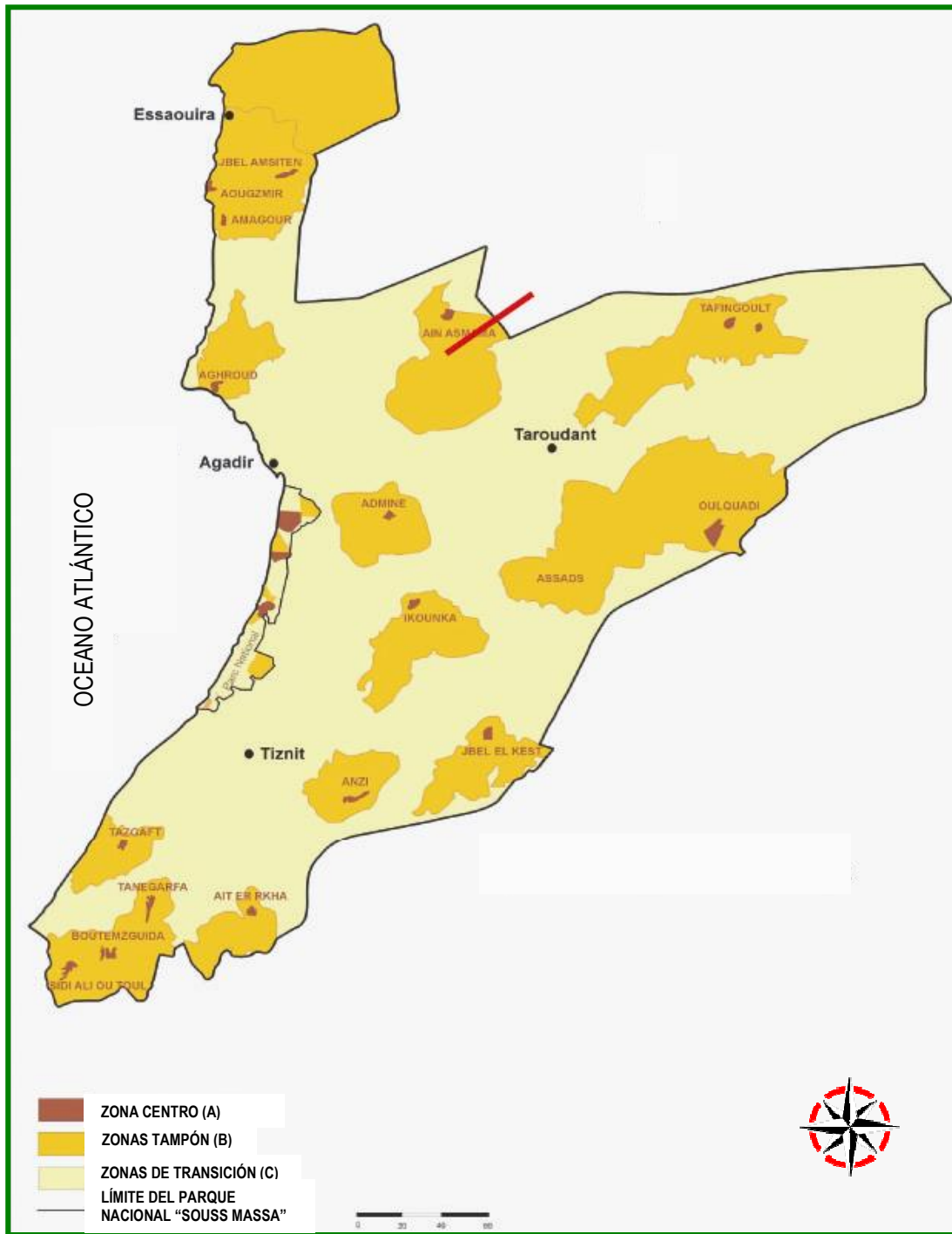
Figura 2. Principales usos de los bosques de arganes (Fuente: Belyazid, 2000).

En la actualidad existen un gran número de cooperativas de producción parcialmente mecanizada de aceite que respetan el “desarrollo sostenible” de este producto natural tanpreciado y escaso. En paralelo, se llevan a cabo estudios con el objetivo de conocer la biología del argán, regeneración e incremento de la producción en un intento por mejorar de forma notable la calidad (Moussouris y Regato, 1999; Moussouris y Pierce, 2000). Los factores que influyen en la calidad del aceite se presentan en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Factores que influyen en la calidad del aceite de argán.

En 1998 los bosques de arganes son declarados por la UNESCO “Reserva de la Biosfera”, debido a la diversidad de funciones y usos que aportan a la población local (aceite, ecoturismo, productos autóctonos...) y abarcan un área de 25.687 Km<sup>2</sup> (6.347 ha) (Chaussod *et al.* 2005). Diversas ONGs medioambientales actualmente intervienen en su conservación. Entre ellas, el Programa Mediterráneo del WWF (*World Wide Fund for Nature*) financia la puesta en marcha de actividades en esta zona como parte de proyectos de conservación (**Figura 4**).



**Figura 4.** Localización de las principales zonas de cultivo del argán.

El mapa muestra los contornos de los bosques de arganes. La zona centro (A) disfruta de un estatus legal que garantiza la protección de paisajes, ecosistemas y especies que se encuentran en ella. En la zona (B) se pone especial énfasis en el uso sostenible de recursos naturales para el beneficio de las comunidades locales. La zona de transición (C) se extiende fuera de la reserva de la biosfera (UNESCO), puede servir como un lugar para actividades agrícolas, etc. (Fuente: Estudio de Impacto, 2006).

## **II. OBJETIVOS**





El aceite de argán es un producto milenario consumido y apreciado en regiones muy concretas de Marruecos, tanto por sus propiedades culinarias y organolépticas como por ciertos efectos terapéuticos, atribuidos de forma ancestral. Su producción prácticamente se reduce a estas regiones. Fuera de estas latitudes hasta hace poco, era conocido únicamente como producto exótico adquirido por visitantes. Sin embargo, en la última década, el aceite de argán es muy empleado en la industria cosmética, y ha despertado gran interés científico por su valor nutricional y propiedades beneficiosas para la salud.

Sin embargo, los métodos de extracción tanto el tradicional como el semi-industrial o parcialmente mecanizado, siguen siendo un tanto precarios. De la amplia revisión bibliográfica realizada, se deduce que existen muy pocos trabajos de investigación enfocados al estudio de parámetros de calidad y composición de este aceite virgen, no sometido a proceso de refinado. Un conocimiento más profundo ayudaría sin duda, al desarrollo socioeconómico de las zonas de producción en las que además, el cultivo del árbol del argán tiene un gran impacto medioambiental. Paralelamente, podría contribuir a potenciar su consumo nuevas aplicaciones en la industria alimentaria, incluso como alimento con propiedades funcionales.

El **objetivo general** de esta memoria de Tesis Doctoral ha sido determinar los parámetros de calidad y los principales componentes con interés nutricional en una muestra estadísticamente representativa, valorando su posible efecto antiinflamatorio.

En base a todo lo expuesto, los **objetivos específicos** de este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar los principales parámetros físico-químicos utilizados como criterios de calidad, valorando la influencia del proceso de extracción.
2. Determinar otros compuestos y/o parámetros de interés relacionados con la pureza del aceite, como son contenido en ceras e índice de refracción.
3. Cuantificar la presencia de elementos traza con actividad pro-oxidante (Fe, Cu, Cr y Mn), así como el contenido de Pb, metal muy ubicuo y con elevada toxicidad en humanos.
4. Caracterizar su composición en ácidos grasos y compararla con la de otros aceites vegetales comestibles.
5. Evaluar el contenido en polifenoles totales y tocoferoles y su posible relación con la capacidad antioxidante total del aceite de argán.
6. Estudiar el efecto antiinflamatorio a nivel intestinal de la administración de aceite de argán virgen en la dieta de ratas, en comparación con la administración de aceites de oliva virgen extra y girasol.



### **III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 1. ORIGEN GEOGRÁFICO Y CARACTERÍSTICAS DEL ARGÁN

El argán se extiende en una estrecha franja de tierra a lo largo de la costa Atlántica, a 29° y 32° de latitud norte (Rezanka y Rezanková, 1999). Crece tanto en superficies llanas como montañosas, entre altitudes que oscilan desde el nivel del mar y los 1550 metros. Es la 3ª especie vegetal más extendida en Marruecos, abarcando un área que alcanza 828.000 Ha (Bousselmame *et al.* 2001). Las condiciones climáticas son muy variadas, con lluvias que oscilan desde los 50 a 500 mm/año (Belyazid, 2000). También crece en el Desierto de Negev en Israel (Nerd *et al.* 1994; Yagmur *et al.* 2001).

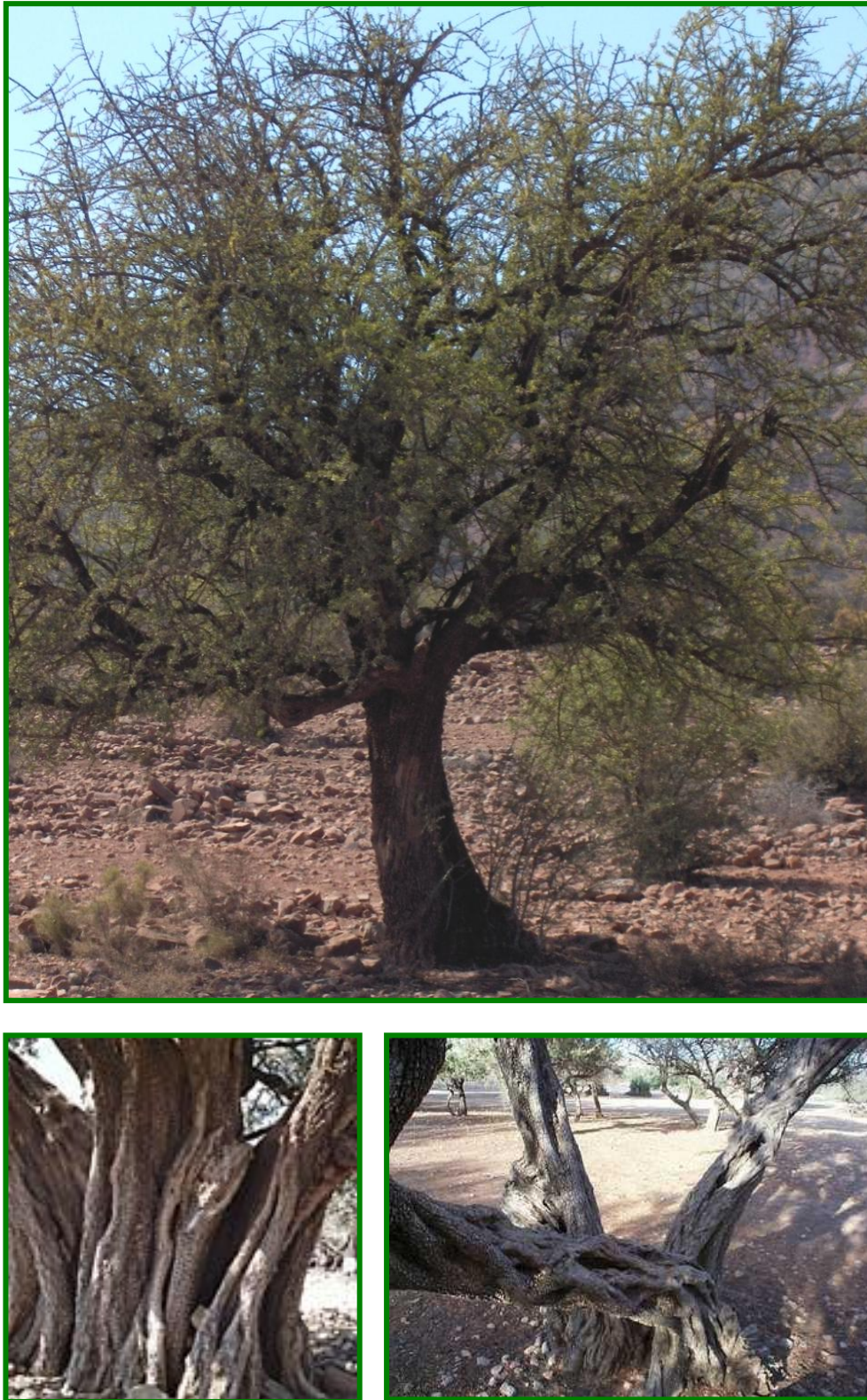
El argán, es una angiosperma, espinosa y de tamaño mediano. Pertenece a la familia de las sapotaceas, compuesta por 600 especies y 40 géneros, de los cuales, los más próximos al género *Argania* están representados por el género *Sideroxylon* en Madeira (*Sideroxylon marmulano*) y el género *Bumelra* en América del Norte (Argan Oil Company, 2006.).

Es un árbol longevo, normalmente vive durante unos 125 a 150 años, pero puede incluso alcanzar los 250 a 400 años. Especie reliquia del Terciario, es el único miembro de la familia tropical *Sapotaceae* que se encuentra en el norte del Sahara y la única especie del género *Argania*.

El árbol de argán es probablemente la especie más genuina y con mejor capacidad de adaptación a su hábitat. Crece bastante bien en suelos calcáreos, aluviones y hasta en tierras salinas (Radi, 2003). El árbol se parece mucho a un olivo y la altura de un ejemplar adulto puede variar desde 8 hasta casi 10 metros según las condiciones climáticas. La copa es muy densa y amplia, con hojas perennes. En caso de sequía sin embargo, el árbol puede disminuir su ritmo metabólico y dejar caer sus hojas por completo o en parte, para reducir así la transpiración. Cuando el agua está de nuevo disponible, puede recuperar rápidamente el follaje, recobrando su metabolismo normal (Belyazid, 2000).

El tronco presenta múltiples ramas cruzadas con espinas abundantes y largas (2 – 3 cm) (**Figura 5**), las hojas son pequeñas y lanceoladas (Radi, 2003). El árbol está en flor desde mayo hasta junio y sus flores hermafroditas tienen un color amarillo-verdoso, a veces blanquecino (Rezanka y Rezanková, 1999; Radi, 2003).

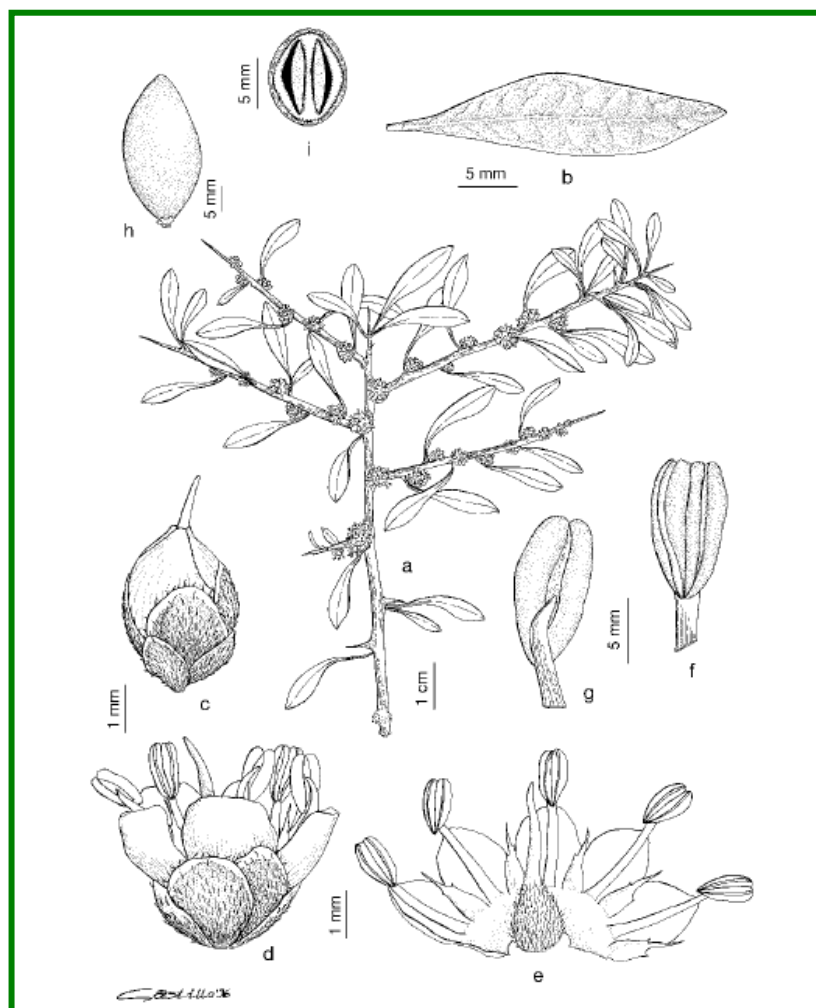
El fruto es una drupa verde-amarillenta formada por un exterior carnoso y amargo, denominado pericarpio o “pulpa”, que presenta diversas formas y dimensiones, pudiendo ser redonda, ovoide o cónica (Alaoui *et al.* 2002). En su interior contiene un hueso o “pseudo-endocarpo” de carnoso albúmen oleaginoso que contiene entre 1 y 3 semillas, que se presentan generalmente unidas (Rezanka y Rezanková, 1999) (**Figura 6**).



**Figura 5.** Árbol de argán (arriba) y detalles del tronco (abajo).

La producción media anual de fruto es de 8 kilogramos por árbol; necesita un año para madurar y su producción oscila dependiendo de la edad del árbol, densidad de población y pluviometría (Argan Oil Company, 2006).

Actualmente, las plantaciones del argán no se están regenerando, lo que puede afectar a su existencia a largo plazo. La deforestación a gran escala, puede producir problemas de salinización en climas áridos, donde la evaporación normalmente excede a la precipitación. La germinación y la etapa de plántula son los periodos más críticos para la consolidación de la planta. La concentración de sales (especialmente de NaCl) es uno de los factores a controlar en la germinación, supervivencia y crecimiento de la plántula (Bani-aameur y Sipple-Michmerhuizen, 2001). Un estudio llevado a cabo por Alounani y Bani-Aameur (2003) reveló la influencia positiva que ejercía la luz para mejorar la germinación, otro factor limitante para su cultivo en viveros.



**Figura 6.** *Argania spinosa*, Safi, pr. Yurf al-Yhudī, Marruecos (MA 299394): a) rama; b) hoja; c) capullo floral; d) flor; e) flor abierta; f) y g) antera; h) fruto; i) corte transversal del fruto.



Como se ha comentado anteriormente, el argán podría datar de la era del Terciario donde presumiblemente existía una conexión entre Marruecos y las costas de las Islas Canarias y predominaba un clima subtropical; colonizó entonces, una gran parte de Marruecos.

En el Cuaternario, el cambio climático, que trajo consigo grandes precipitaciones y bajas temperaturas, lo relegó hacia el suroeste, lo que podría explicar la existencia actual de algunas colonias en Rabat (región de Khémisset, unas 30 hectáreas) y de otras al norte, cerca de la costa mediterránea, en los montes de Beni Snassen (800 hectáreas).

Los antiguos Fenicios fueron probablemente testigos de su existencia. Algunos registros escritos de la extracción del aceite de argán datan del siglo XIII después de Cristo. En 1219, Ibn Al Baythar, científico y geógrafo árabe, describe en su “Tratado de lo Simple” el árbol y la técnica de extracción del aceite: *“Un árbol de gran tamaño, espinoso, que da una fruta del volumen de una almendra y contiene un hueso que se machaca y del que se extrae aceite para usarlo en preparaciones culinarias”*. Posteriormente, en 1791, Hösst menciona el uso del aceite en las fábricas de jabón de Marsella y en 1888, Cotton aísla un principio activo del orujo obtenido tras la extracción del aceite, identificado como una mezcla de saponinas, que llamó arganina. El aceite se exporta a Europa durante el siglo XVIII, pero es desplazado del mercado debido a su fuerte sabor y a la popularidad creciente del aceite de oliva (Mousouris y Pierce, 2000).

Ya en el siglo XX, concretamente en 1924, el “sector” del aceite de argán es mencionado por Braum Blanquet en sus memorias “Estudios de la vegetación y flora Marroquí”; en el mismo año, Emberger habla de la existencia de arganes en el alto valle del Grou Wadi entre Tedders y Rommani. Descubre otro islote de arganes en la cara norte del macizo montañoso de Beni Snassen al norte de Oujda, y concreta en 1925 la antigua extensión de la especie.

Por último, las primeras referencias al interés por las propiedades saludables del aceite de argán y el resto de productos derivados del árbol se atribuyen a Battino hacia el año 1929 (Mousouris y Pierce, 2000).

## 2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL ACEITE DE ARGÁN

Encontramos 3 métodos generales de obtención del aceite:

- Método tradicional o artesanal.
- Método de extracción parcialmente mecanizado o semi-industrial.
- Método de extracción por disolventes.

### 2.1. Método tradicional o artesanal

Tradicionalmente, la extracción del aceite de argán se ha realizado por mujeres de la zona (Charrouf y Guillaume, 1999). La extracción es bastante laboriosa, comenzando con la recolección del fruto, generalmente entre los meses de junio y septiembre, cuando ya está maduro (**Figura 7**).

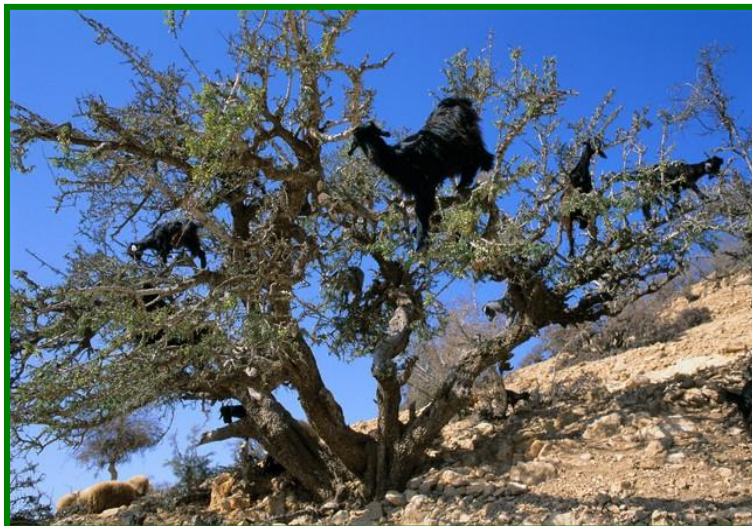
Las ramas presentan largas espinas, lo que dificulta coger los frutos directamente del árbol; para realizar esta operación hay tres opciones: primera, esperar hasta que los frutos estén suficientemente maduros y caigan al suelo (**Figura 8**). Segunda, recolectar los frutos con ayuda de un palo o arrojando piedras. Y tercera, aprovechar la destreza de las cabras para subir a la copa del árbol y comer los frutos (**Figura 9**). Más tarde se purga el estiércol para buscar los huesos, ya despojados de la pulpa a lo largo del tracto digestivo de las cabras. Hasta que los frutos estén maduros, los animales se mantienen fuera de los bosques de arganes.



**Figura 7.** Frutos del argán en el momento óptimo de recolección (Fuente: The Epoch Times, 2006).



**Figura 8.** Proceso de recolección de frutos maduros (Fuente: Mille et une Huiles, 2006).



**Figura 9.** Cabras alimentándose del fruto del argán (Fuente: Pour la Sauvegarde de l'Arganier, 2006).

En cualquier caso, después de la recolección, los huesos se rompen para obtener las semillas que, tradicionalmente, se abren usando piedras. Después de secarlas al aire pueden ser tostadas mediante calentamiento más o menos suave en un recipiente de terracota hasta obtener el color, olor y sabor característico de este aceite; o también pueden utilizarse directamente sin tostar. Se trituran manualmente en una muela rotatoria similar a las utilizadas para los cereales hasta conseguir una pasta oleosa (Lybbert *et al.* 2002). Esta pasta se mezcla a mano con agua templada durante unos minutos; esta operación condiciona la calidad del aceite, siendo negativo un exceso de agua así como de temperatura. La pasta se prensa manualmente y la emulsión oleosa de cierto color marrón es decantada hasta obtener el aceite (Charrouf y Guillaume, 1999) (**Figuras 10, 11 y 12**).

El aceite se envasa, generalmente en botellas de plástico reutilizable, para ser consumido por la familia o vendido en el mercado local del pueblo por el cabeza de familia (Lybbert *et al.* 2002).

El residuo de extracción o “torta de orujo” es de color marrón oscuro casi negro y puede contener hasta un 20% de aceite. Es muy apreciado como alimento para el ganado (Charrouf y Guillaume, 1999).

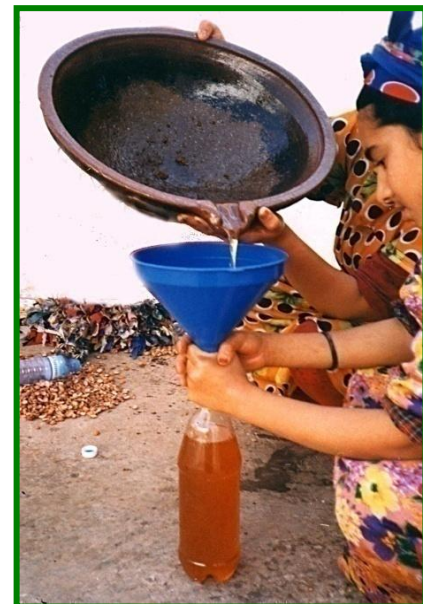
El esquema del proceso aparece recogido en la **Figura 13**.



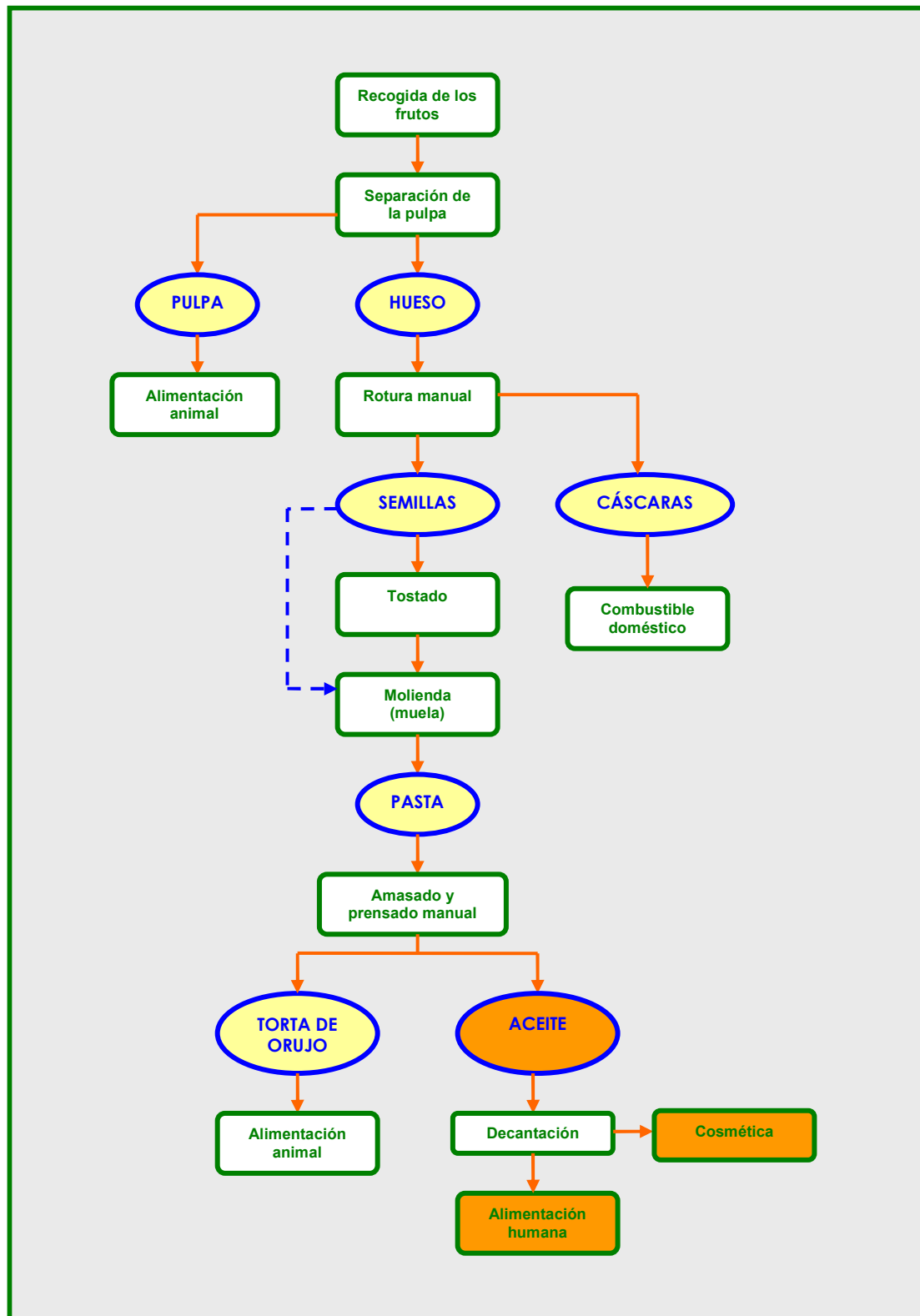
**Figura 10.** *Izquierda:* proceso de rotura de huesos de argán. *Derecha:* tostado de las semillas de argán.



**Figura 11.** *Izquierda:* proceso de molienda con la muela rotatoria. *Derecha:* amasado de la pasta.



**Figura 12.** *Arriba:* proceso de prensado manual. *Derecha:* decantación del aceite.



**Figura 13.** Procedimiento tradicional de extracción del aceite de argán.

En cuanto a datos sobre el rendimiento en aceite de argán obtenido mediante el método tradicional, en bibliografía aparece un estudio realizado en distintas poblaciones de Marruecos que indica que de la semilla, que puede contener hasta un 50% de aceite, se extrae con un rendimiento menor al 30% (Rahmani, 1995).

Los principales inconvenientes que presenta el método tradicional son:

- Pérdidas económicas, debido a un bajo rendimiento en la extracción, apenas permite obtener más de un 30% de aceite respecto a la semilla seca y limpia, quedando en la torta de orujo entre un 20 a 25% de aceite.
- La maquinaria y utensilios metálicos utilizados pueden aportar trazas metálicas que actúan como catalizadores en el proceso de oxidación.
- Baja calidad higiénica y sanitaria en todo el proceso.
- Las semillas de argán no se procesan inmediatamente, lo que repercute en las características organolépticas del aceite.
- Mala conservación del aceite, debido a la dificultad para separar totalmente el agua añadida durante el proceso de extracción. Además, al emplear cierta cantidad de agua, el aceite se empobrece notablemente en polifenoles favoreciendo el proceso de enranciamiento.
- Dureza física del método de obtención.
- Técnica de extracción muy lenta, necesitándose alrededor de 10-12 horas para obtener un litro de aceite.

Para mejorar la conservación del aceite y evitar el proceso oxidativo, Rahmani (1995) propone las siguientes condiciones:

- Materia prima de mejor calidad.
- Adición de agua en mínima cantidad.
- Respeto por las normas de higiene a la hora de la extracción.
- Buena decantación, que permita separar el aceite del agua.
- Acondicionamiento en envases opacos, preferentemente.

## **2.2. Método de extracción parcialmente mecanizado o semi-industrial**

Recientemente a fin de incrementar el rendimiento, la calidad y el valor comercial de este preciado aceite, se han creado diversas cooperativas que aplican un proceso más mecanizado. La principal diferencia con el método tradicional radica en la introducción de prensas mecánicas en las que no se precisa incorporar agua a la pasta de las semillas trituradas. Esto supone menor deterioro del aceite y menor pérdida de componentes minoritarios con importancia biológica. Los demás pasos permanecen prácticamente sin cambios. En algunos casos la separación de la pulpa, proceso de tostado, decantación,

filtración y envasado también se realizan de forma mecánica. Mountasser y El-Hadek (1999) evalúan los principales factores que influyen en la extracción del aceite de argán mediante el método de presión con prensa hidráulica, siendo éstos el grosor y tamaño de partícula de la semilla, presión aplicada, temperatura y pre-secado de semillas del argán.

Por tanto, en la extracción semi-industrial se contemplan las siguientes etapas:

- **Despulpado:** se puede realizar mecánicamente desprendiendo la pulpa del hueso. Esta fase es seguida del clasificado, que consiste en la separación en distintos contenedores del hueso y la pulpa. Ésta última es vendida a los ganaderos para alimentación del ganado.
- **Rotura del hueso:** es la etapa que continúa siendo más laboriosa. La principal tarea de las mujeres en las cooperativas consiste en romper el hueso para extraer las semillas. La dureza de esta etapa podría paliarse con una adaptación de la maquinaria para realizar esta tarea (**Figuras 14, 15 y 16**).
- **Tostado:** las semillas así obtenidas y unas vez lavadas, pasan normalmente por un proceso de tostado suave mecanizado, con una duración media de 10 minutos.
- **Molturación y prensado:** esta fase a diferencia del método tradicional se realiza mediante una prensa mecánica (**Figura 17**).
- **Decantación:** el aceite obtenido después del prensado de las semillas pasará por un proceso de decantación durante unos 15 días.
- **Filtración y envasado:** proceso que se realiza mecánicamente.
- **Etiquetado:** según la Norma de Calidad Marroquí sobre el aceite de argán (N.M. 08.5.090), todos los recipientes o envases destinados a la venta directa al consumidor, deberán contemplar la siguiente información en su etiqueta:
  - **Denominación específica del producto:** las distintas denominaciones son:
    - **Aceite de argán virgen:** es el aceite obtenido de las semillas del fruto del argán únicamente mediante procedimientos tradicionales o mecánicos bajo unas condiciones térmicas determinadas, que no ocasione el menor cambio en el aceite, y que no ha sido sometido a ningún otro tratamiento que no sea el tostado de las semillas, presión, decantación, centrifugación y filtración. Se clasifican en:
      - **Aceite de argán virgen extra:** presenta una acidez libre expresada en ácido oleico con un máximo de 1 g/100 g.
      - **Aceite de argán virgen fino:** presenta una acidez libre expresada en ácido oleico con un máximo de 2 g/100 g.
      - **Aceite de argán virgen corriente:** presenta una acidez libre expresada en ácido oleico con un máximo de 3,3 g/100 g.
      - **Aceite de argán virgen lampante:** presenta acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 3,3 g/100 g.
  - **Contenido neto.**
  - **Nombre y dirección del fabricante, del distribuidor o del exportador.**

- *País de origen.*
- *Identificación del lote:* cada envase debe llevar una inscripción grabada o una marca indeleble, que permita identificar el lote.
- *Fecha de consumo preferente.*
- *Condiciones de almacenamiento.*

En los embalajes de expedición del aceite, además de las indicaciones obligatorias para los envases, se debe indicar el tipo y número de envases que contienen.

Pruebas realizadas por Rahmani (1995) en la Cooperativa de Tidzi para estudiar el rendimiento del método de extracción semi-industrial, dieron como resultado valores que pueden alcanzar el 40%, lo que supone una mejora en la producción de este aceite, comparado con el procedimiento tradicional o artesanal, que se debe principalmente a la mecanización del prensado.

Por tanto, las ventajas del método de extracción semi-industrial son:

- Disminución de la pérdida de aceite en la torta de orujo.
- Redimiento de obtención del aceite hasta del 40%.
- Reducción al 50% del tiempo necesario para la extracción del aceite (aproximadamente 6-7 horas frente a 10-12 horas del método tradicional).
- Mejora de la calidad higiénico-sanitaria del proceso de obtención.
- Información para el consumidor aportada en el etiquetado sobre el producto que se adquiere.

Aún así, la etapa de rotura del hueso consume el 65% del tiempo total y es donde se necesita realmente industrializar el proceso para reducir la dureza y duración de la extracción del aceite. El esquema general del procedimiento semi-industrial de extracción del aceite de argán anteriormente descrito aparece en la **Figura 18**. Según Hilali *et al.* (2005), los aceites extraídos de forma semi-industrial, preservan mejor sus características fisicoquímicas y organolépticas. Este estudio también evidencia mayor calidad en los aceites obtenidos de semillas de argán recién recolectadas.

### **2.3. Método de extracción por disolventes**

El aceite así obtenido se destina sólo para uso industrial, principalmente del sector de la cosmética. El aceite de argán se extrae utilizando un disolvente orgánico volátil. Después de la evaporación del disolvente tras uno o dos ciclos de extracción, el aceite es obtenido con un rendimiento de hasta un 50%. Sin embargo, este tipo de extracción



proporciona un producto con peores propiedades organolépticas, comparado con el que se obtiene con los métodos tradicional o semi-industrial (Charrouf y Guillaume, 1999).



**Figura 14.** Rotura de huesos de argán (Fuente: Exile Images, 2006).



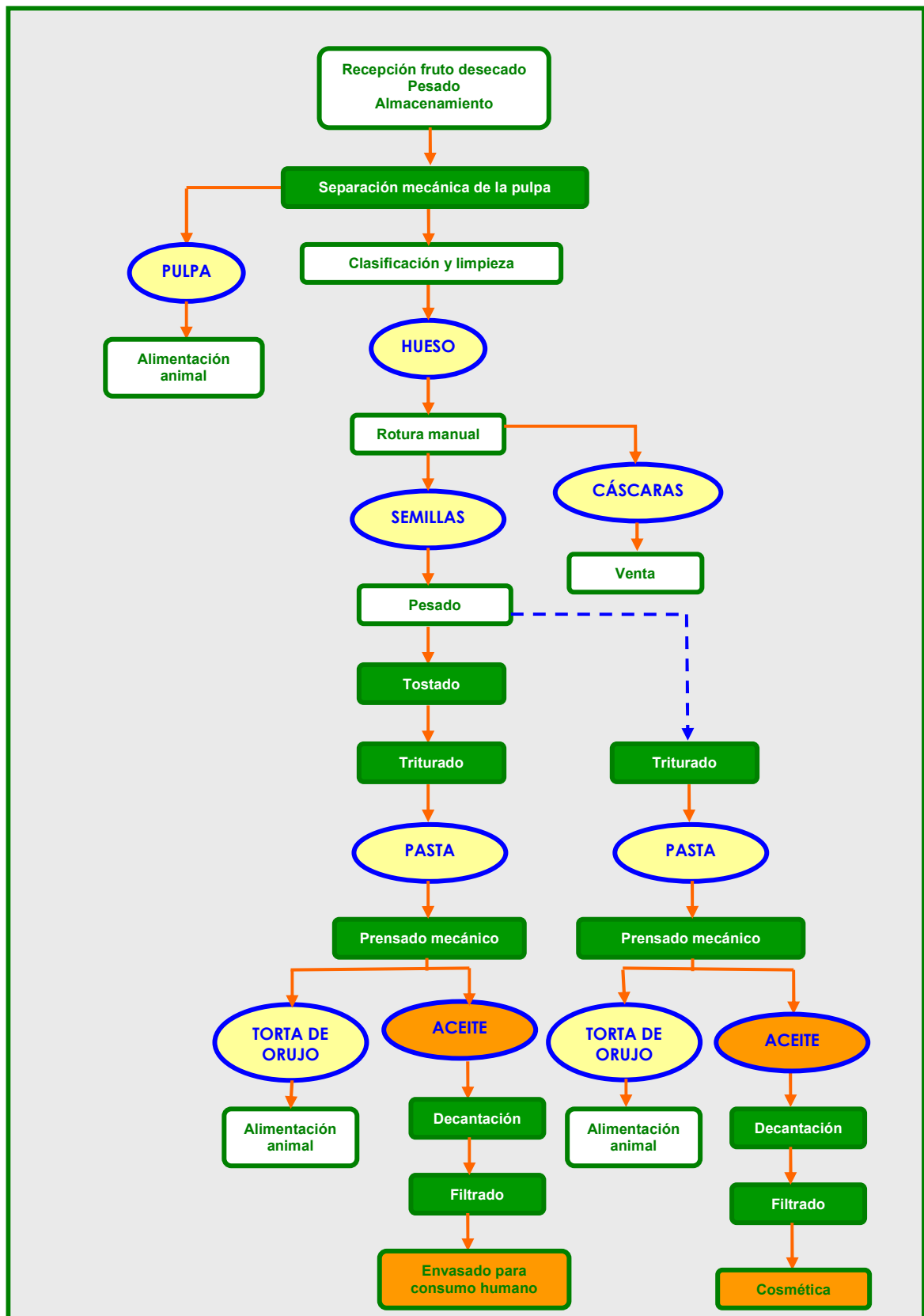
**Figura 15.** Semillas obtenidas tras el proceso de rotura del hueso (Fuente: Zit Sidi Yassine, s.a.r., 2006).



**Figura 16.** Proceso de control de calidad de semillas de argán en la cooperativa local "Taitmatine" en Ait Baha (Fuente: Max Planck Institute for Social Anthropology, 2006).



**Figura 17.** Tostadora mecánica (**izquierda**) (Fuente: Saudi AramcoWorld, 2006) y equipo para prensado y filtración (**derecha**) (Fuente: Zit Sidi Yassine, s.a.r., 2006).



**Figura 18.** Procedimiento semi-industrial de extracción del aceite de argán. Proceso con tostado (destinado a consumo humano) y proceso sin tostado (destinado a cosmética). Las etapas coloreadas en verde corresponden a operaciones que pueden estar mecanizadas.

### 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE ARGÁN

Como en cualquier otro aceite vegetal, los componentes del aceite de argán se pueden dividir en dos categorías (Mataix y Martínez de Victoria, 1988):

- Fracción saponificable: representa casi la totalidad del peso del aceite (99% en el total de su peso), constituida por triacilglicéridos y ácidos grasos libres (**Figura 20**).
- Fracción insaponificable: presente en una concentración muy pequeña respecto a la anterior, pero con gran importancia ya que añade valor biológico al aceite e influye en su conservación. Está compuesta principalmente por vitaminas liposolubles, hidrocarburos, esteroides, alcoholes triterpénicos, pigmentos y compuestos volátiles con gran repercusión en el flavor del aceite (**Figura 23**).

#### 3.1. Fracción saponificable

##### 3.1.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son las moléculas lipídicas con mayor interés nutricional. Son ácidos monocarboxílicos de cadena lineal de entre 4 y 36 átomos de carbono. Se encuentran raramente libres y suelen formar parte de triacilglicéridos, fosfolípidos y ésteres del colesterol. Las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos pueden ser, saturadas cuando no contienen dobles enlaces o insaturadas, cuando los contienen. La disposición de los dobles enlaces es sistemática y modifica la configuración espacial, y por tanto las propiedades físicas de la molécula. Éstas dependen del grado de insaturación y de la longitud de su cadena hidrocarbonada. Así, a medida que aumenta el grado de insaturación y disminuye el número de carbonos, el ácido graso va adquiriendo polaridad (Larsson, 1994).

En la mayoría de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), el doble enlace se encuentra situado entre los carbonos C9 y C10. En el caso de los poliinsaturados (AGPI), los dobles enlaces suelen situarse en las posiciones  $\Delta^{12}$  y  $\Delta^{15}$ . Estos dobles enlaces no suelen encontrarse conjugados, sino que mantienen un grupo metileno entre las dos insaturaciones. La configuración más frecuente es la *cis*, sin embargo existen procesos naturales y procedimientos industriales que transforman estos enlaces a *trans*.

Dentro de los AGMI, el principal representante es el ácido oleico (*cis* 18:1 *n*-9) presente en casi todas las grasas vegetales, especialmente en el aceite de oliva, donde

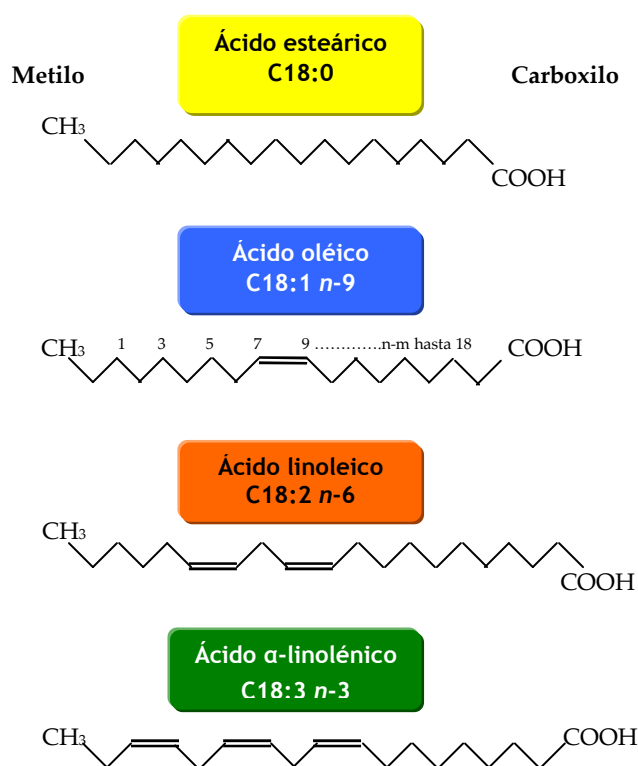
puede alcanzar hasta un 80%; este ácido graso es difícil de oxidar y actúa reduciendo significativamente los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) e incluso, incrementando levemente, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Gimeno *et al.* 2002) de modo similar a una dieta enriquecida en AGPI (Berrougui *et al.* 2003; Cherki *et al.* 2006).

Los AGPI se clasifican en función de la posición del último doble enlace respecto al metilo terminal de la molécula; según esto, existen dos familias: los AGPI *n*-6 y los *n*-3. La mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por los mamíferos a partir de los hidratos de carbono de la dieta, pero hay dos de ellos: el ácido linoleico (18:2 *n*-6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 *n*-3) que no pueden ser sintetizados de forma endógena y sin embargo, son necesarios como precursores de los AGPI de cadena larga y para el correcto funcionamiento del organismo. Estos ácidos grasos se denominan “esenciales” ya que deben ser obligatoriamente ingeridos a través de los alimentos.

Por otro lado, los AGPI de la serie *n*-3 derivan del ácido  $\alpha$ -linolénico, que es mayoritario en plantas de hoja verde oscuro y en los aceites de semillas de lino y colza, nueces, grosella y en la soja. A partir de éste se sintetizan los ácidos eicosapentaenoico (20:5 *n*-3) y docosahexaenoico (22:6 *n*-3), que también pueden ser ingeridos a través de la dieta. Los animales que viven en el fondo del mar, al igual que las algas y el plancton marino, son ricos en estos AGPI *n*-3 (Mesa *et al.* 2006; Valenzuela y Uauy, 2005).

Según Charrouf *et al.* (1999), Khallouki (2003) y Khallouki *et al.* (2003), los ácidos grasos mayoritarios en el aceite de argán son oleico, linoleico, esteárico y palmítico (**Figura 19**). Este aceite tiene un alto contenido en ácido oleico (45%), que resulta bastante elevado con respecto a otros aceites de semillas; es también rico en AGPI (35%), destacando el ácido linoleico, mientras que el ácido  $\alpha$ -linolénico está solamente presente a niveles de trazas. Los ácidos grasos saturados (AGS) se encuentran en cantidades semejantes a las de otros aceites vegetales.

Esta composición en ácidos grasos unida a ciertos componentes de la fracción insaponificable, confieren a este peculiar aceite propiedades beneficiosas para la salud humana. De acuerdo a los autores anteriormente citados (Charrouf *et al.* 1999; Khallouki, 2003 y Khallouki *et al.* 2003), el consumo de aceite de argán asegura un aporte apropiado de AGPI esenciales, mejorando así el perfil lipídico asociado a patologías relacionadas con el daño oxidativo, como son la enfermedad cardiovascular y la diabetes.



**Figura 19.** Estructura de los principales ácidos grasos presentes en el aceite de argán.

### 3.1.2. Triacilglicéridos

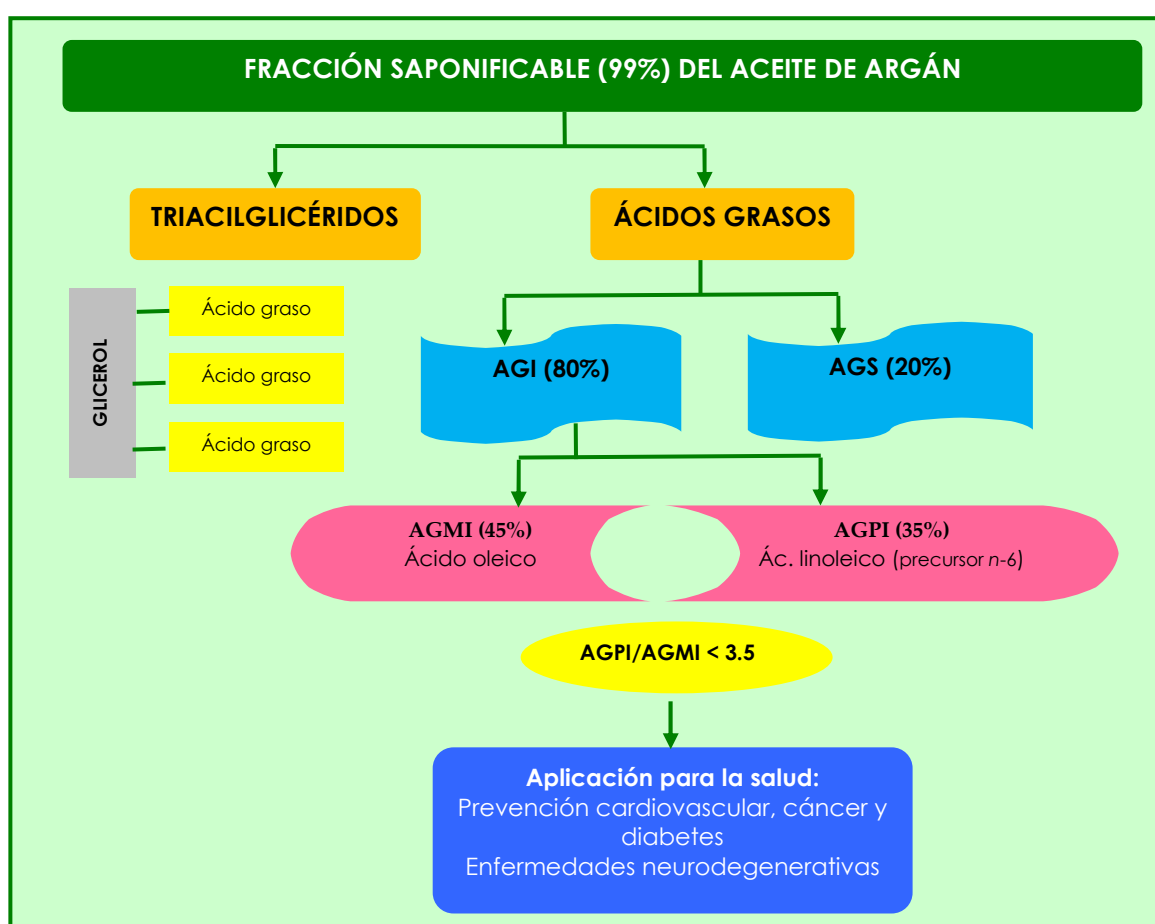
Los ácidos grasos se almacenan como triacilglicéridos, que son moléculas formadas por tres ácidos grasos unidos mediante un enlace éster a una molécula de glicerol. Aquellos que están constituidos por el mismo ácido graso se denominan triacilglicéridos simples. Cuando contienen diferentes ácidos grasos se denominan mixtos. Debido a que las partes polares del glicerol y las de cada ácido graso se encuentran implicadas en el enlace éster, la molécula no contiene grupos polares libres, por lo que es esencialmente apolar y por tanto, insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos. En cualquier caso, la polaridad global de la molécula depende del grado de insaturación y de la longitud de cadena de los ácidos grasos constituyentes (Puerta, 2003).

En el aceite de argán, la mayoría de los triacilglicéridos incluyen tres residuos de ácido oleico (O, O, O), dos de ácido linoleico y uno de oleico (L, L, O), uno de palmítico, uno de oleico y uno de linoleico (P, O, L), dos de oleico y uno de linoleico (O, O, L) o uno de palmítico y dos de oleico (P, O, O) (Charrouf y Guillaume, 1999). Diversos análisis por HPLC de triacilglicéridos en aceite de argán (**Tabla 1**) muestran que los ácidos grasos saturados (palmítico o esteárico) generalmente sustituyen al glicerol en los extremos (Sn-1 y Sn-3) mientras que el ácido linoleico generalmente esterifica al segundo alcohol

glicérico (Sn-2). El ácido oleico puede ser igualmente encontrado en cualquiera de estas tres posiciones (Maurin *et al.* 1992; Charrouf y Guillaume, 1999).

**Tabla 1.**  
Distribución de ácidos grasos en las tres posiciones del glicerol (%) en el aceite de argán (Fuente: Charrouf y Guillaume, 1999).

Ácido graso	Sn-1	Sn-2	Sn-3
Palmítico	54,0	9,4	36,6
Estearico	19,4	1,7	78,9
Oléico	33,3	39,7	27,0
Linoleico	29,5	40,0	30,5



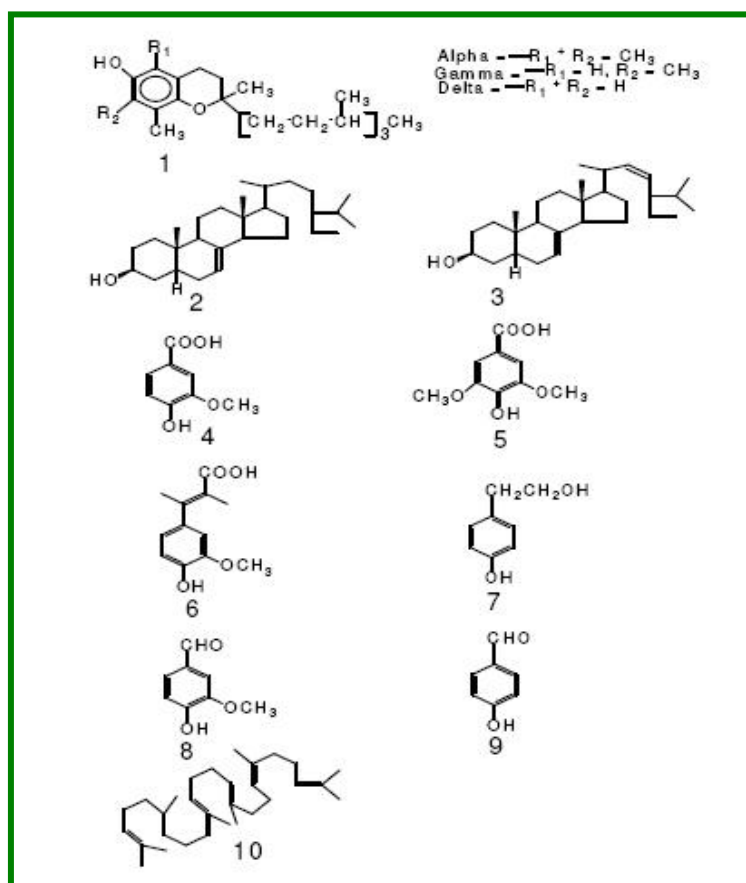
**Figura 20.** Fracción saponificable del aceite de argán y su aplicación para la salud.

### 3.2. Fracción insaponificable

Se denomina insaponificable al conjunto de constituyentes de los aceites que no reaccionan con la sosa o potasa para dar jabones, y que tras la saponificación continúan siendo solubles en los disolventes clásicos de las grasas (hexano, éter, etc.). La fracción

insaponificable del aceite de argán, también denominada “*componentes menores*”, representa una pequeña fracción del total, aproximadamente un 1 – 1,5%, compuesta principalmente por carotenos, tocoferoles, alcoholes triterpénicos, esteroides y xantofilas (**Figura 21**). Estas sustancias son de gran interés nutricional por su carácter antioxidante y son las responsables en gran medida, de la estabilidad del aceite y de sus características organolépticas (Ramirez y Quiles, 2005).

Los componentes minoritarios de los aceites vegetales se pierden durante los procesos de refinado (Ramirez y Quiles, 2005), esto no ocurre en el aceite de argán, pues aún siendo un aceite de semillas no se somete a este proceso. Estos compuestos minoritarios que se encuentran en concentraciones muy bajas, del orden de ppm, se caracterizan por presentar una potente actividad antioxidante, y entre ellos destacan la vitamina E y los compuestos fenólicos (Mataix, 2001; Ramirez y Quiles, 2005). Su presencia aparece altamente influenciada por diversos factores ambientales, como son la variedad del fruto, sistema de elaboración y conservación del aceite. Esta fracción es empleada en el estudio de las características específicas y genuinidad de un aceite (Civantos, 1999; Aparicio *et al.* 2003). Comentaremos a continuación, algunos de estos compuestos.



**Figura 21.** Compuestos detectados en la fracción insaponificable del aceite de argán. 1. Tocoferoles. 2. Escotanol, 3. Espinasterol, 4. Ácido vinílico, 5. Ácido siríngico, 6. Ácido ferúlico, 7. Tiroso, 8. Ácido vanílico, 9. Ácido *p*-hidroxibenzoico y 10 (Fuente: Khallouki *et al.* 2005).

### 3.2.1. Esteroles

Los esteroides comprenden una familia de sustancias que contienen un núcleo común esteroídico de 17 átomos de carbono, más una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un grupo alcohol o hidroxilo en el carbono 3 (Ziller, 1996). Constituyen una porción considerable de la fracción insaponificable del aceite. El contenido total de esteroides en el aceite de argán es del 20% de esta fracción (Khallouki *et al.* 2005).

Se han encontrado cuatro esteroides relevantes; los dos mayoritarios son espinasterol y escotenol (40 y 48% respectivamente, del total de esteroides), éste último con propiedades anticancerígenas; los dos minoritarios (estigmasta-8,22-dien-3 $\beta$ -ol y estigmasta-7,24-28-dien-3 $\beta$ -ol) han sido aislados en una proporción del 4% del total de esteroides (Farines *et al.* 1981). Curiosamente, los  $\Delta$ -5 esteroides ( $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol), que aparecen frecuentemente en otros aceites vegetales, no han sido aislados en el aceite de argán (Charrouf y Guillaume, 1999; Khallouki *et al.* 2003). No es frecuente encontrar espinasterol y escotenol en los aceites vegetales. El espinasterol ha sido descrito como el fitoesterol característico de la familia de las sapotaceas (Gunasekera *et al.* 1977). La actividad antitumoral del espinasterol ha sido estudiada por Villaseñor *et al.* (2000) mientras que el escotenol presenta potencial anticarcinogénico (Arisawa *et al.* 1985). Los resultados obtenidos en cuanto a contenido en esteroides en un estudio realizado por Khallouki *et al.* (2003), comparando el aceite de argán con el de oliva y girasol, se muestran en la **Tabla 2**.

<b>Tabla 2.</b>			
<b>Contenido de los principales esteroides en aceites vegetales comestibles (Fuente: Khallouki <i>et al.</i> 2003).</b>			
<b>Esteroides</b>	<b>Tipo de aceite</b>		
	Aceite virgen de argán	Aceite oliva virgen extra	Aceite de girasol
Escotenol	142 $\pm$ 11	Nd	Nd
Espinasterol	115 $\pm$ 7	Nd	Nd
Estigmasta-8-22-dien-3 $\beta$ -ol	9 $\pm$ 1	Nd	Nd
$\beta$ -sitosterol	Nd	156 $\pm$ 3	312 $\pm$ 18
Campesterol	Nd	12 $\pm$ 1	51 $\pm$ 3
Estigmasterol	Nd	Nd	37 $\pm$ 2
Total	295 $\pm$ 20	319 $\pm$ 14	477 $\pm$ 23

Datos expresados en mg/100g $\pm$ SD de análisis duplicados por GC-MS.  
Nd: no detectado

### 3.2.2. Alcoholes triterpénicos

Son un grupo complejo de compuestos que constan principalmente de cinco anillos condensados de ciclohexano con 30 átomos de carbono. Se pueden separar de los esteroides mediante cromatografía. Se encuentran en gran cantidad (100-300 mg/g) en la cutícula de los vegetales. En la fracción insaponificable del aceite de argán se han aislado



diversos alcoholes triterpénicos. Los tres mayoritarios que han sido identificados son butirospermol, tirucalol y  $\beta$ -amirina; otros minoritarios que se han aislado son lupeol, 24-metileno-cicloartenol, citrostadienol y cicloeucalenol. Las principales funciones biológicas descritas para los alcoholes triterpénicos son cicatrizante, protección de la piel, antiinflamatoria y antiséptica (Farines *et al.* 1984; Charrouf y Guillaume, 1999).

### 3.2.3. Hidrocarburos

Los hidrocarburos están presentes en pequeñas cantidades en los aceites vegetales comestibles (< 0,15%); las excepciones son los aceite de argán y de oliva, que exceden de 0,3%. En el aceite de argán el más abundante es el escualeno (hasta 3,2 g/Kg) (Khallouki, 2003; Khallouki *et al.* 2003), un hidrocarburo triterpénico saturado con seis dobles enlaces conjugados, intermediario en la biosíntesis de esteroides, fundamentalmente fitosteroides en plantas y colesterol en animales (Mataix, 2001). Hay estudios que sugieren que el escualeno protege contra el cáncer de piel (Newmark, 1997) y aumenta la excreción de xenobióticos en estudios efectuados con ratas y ratones (Kamimura *et al.* 1992). En diversos estudios con animales de experimentación se ha documentado que produce una reducción de los niveles de colesterol en plasma e hígado, como consecuencia de un incremento de la excreción fecal de colesterol (Uchida *et al.* 1983).

### 3.2.4. Minerales y elementos traza

La determinación de minerales y elementos traza ha adquirido una notable importancia en nutrición humana, tanto desde un punto de vista fisiológico como desde una perspectiva de control de calidad y tecnología de los alimentos. Son numerosos y diversos los estudios de investigación realizados sobre la presencia de elementos esenciales y elementos tóxicos o potencialmente tóxicos, en prácticamente todos los alimentos que componen la dieta habitual; no obstante, son escasos en aceites comestibles, posiblemente debido a la complejidad analítica de este tipo de muestras.

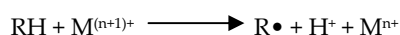
En los aceites vegetales comestibles, se encuentra toda una serie de minerales y elementos traza que al margen de sus propiedades nutricionales, pueden ejercer una notable influencia en los procesos de oxidación y enranciamiento del aceite, como pueden ser Fe, Cu, Cr y Mn. Por otra parte, un elemento con interés toxicológico y que aparece con frecuencia en aceites en concentraciones relativamente elevadas es el Pb. Nos centraremos en estos cinco elementos.

Hierro, Cu, Cr y Mn, ejercen un papel negativo en la estabilidad de los aceites, actuando como catalizadores del proceso de autooxidación, e incrementando la

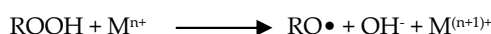
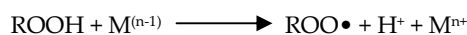
generación de radicales libres. Las fuentes más comunes de estos elementos son las superficies metálicas de los equipos de procesamiento y almacenamiento.

Las reacciones de los metales en los aceites que tienen lugar son las siguientes:

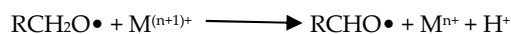
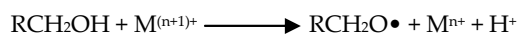
por reacción directa del metal,



por descomposición,



o a partir de los productos de la oxidación secundaria tales como alcoholes o aldehídos (obtenidos a partir de peróxidos e hidroperóxidos):



Después, estos alcoholes secundarios producen cetonas y los aldehídos son oxidados a los correspondientes ácidos carboxílicos. La formación de todos estos compuestos produce pérdidas de calidad del aceite, provocando alteraciones no sólo en sus propiedades fisicoquímicas y nutricionales, sino también en la calidad organoléptica.

## Hierro y cobre

El hierro es esencial para la planta puesto que, entre otras funciones fisiológicas, facilita la respiración y el transporte de oligoelementos. La abundancia de los compuestos de hierro en la naturaleza, justifica su presencia en todos los productos vegetales y animales.

Alemany (1995) indica que, en general, las variaciones en las concentraciones de este metal en productos vegetales depende a menudo, más del lugar de cultivo que de la propia naturaleza del alimento. Este hecho podría explicar, en parte, las diferencias en las concentraciones del metal, en función del tipo de suelo de cultivo, con factores tan importantes como la concentración total del elemento en el suelo y el pH del mismo. La carencia de Fe puede deberse en suelos ácidos, a la interacción de este elemento con un exceso de metales pesados (Rodríguez y Ballester, 1991).

El cobre es un elemento fundamental en la fotosíntesis, en la fase de reproducción de la planta y en la síntesis del ácido ascórbico. Son muchos los productos fitosanitarios que

se emplean como insecticidas, fungicidas, bactericidas, acaricidas o herbicidas, que pueden contener cantidades considerables de este elemento. Paralelamente, las distintas fases de los procesos tecnológicos de obtención del aceite pueden provocar contaminaciones.

La capacidad prooxidativa del Fe y Cu es bien conocida; dichos elementos actúan como catalizadores en la primera etapa del proceso de autooxidación de aceites y grasas, originando radicales libres que favorecen el inicio de este proceso; estos radicales desencadenan toda una serie de reacciones que originan compuestos volátiles como aldehídos y cetonas que son los responsables del característico “olor a rancio” (Di Battista *et al.* 1993; Choe y Min, 2006).

El Cu es un prooxidante muy efectivo a bajas concentraciones (< 1,0 mg/Kg) (Mertens *et al.* 1971; Wong *et al.* 1980; Botta, 1990; Paine y Paine, 1994). Diversos estudios señalan que el poder catalítico del cobre es superior al del hierro (Mertens *et al.* 1971; Prevot *et al.* 1977; Flidder y Oethoeffler, 1981; Romano *et al.* 2007). Su poder prooxidativo se ha demostrado a concentraciones inferiores a 30 ppb (Wong *et al.* 1980). El Cu actúa como prooxidante en la oxidación catalítica de los hidroperóxidos de los aceites, en presencia de oxígeno; se originan cetonas y aldehídos que cambian el flavor de los aceites y nuevos radicales que continúan el proceso de oxidación (Pinto *et al.* 2006). Este elemento ejerce efectos perjudiciales durante el periodo de almacenamiento del aceite y sobre la decoloración de los lípidos. Roca (1997) observa que elevadas concentraciones de Cu están relacionadas con un aumento del grado de acidez del aceite.

## **Cromo y manganeso**

El Cr se encuentra en pequeñas cantidades en todos los alimentos, en concentraciones que oscilan entre < 0,050 µg/g en frutas y 1,225 µg/g en carnes y derivados; la pimienta negra, la levadura de cerveza, carnes e hígado y las patatas tienen altas concentraciones de Cr (entre 0,6 y < 1,6 µg/g). Es de destacar el contenido también elevado en infusiones, té y café (entre 0,3 y 1,5 µg/g) (Cabrera *et al.* 2006). El procesado tecnológico también puede incorporar Cr a los alimentos ya que el acero inoxidable contiene entre un 11 y un 30% de Cr, que puede cederse a los alimentos, sobre todo cuando el medio es ácido. Por ejemplo, este aumento del contenido en Cr se ha observado en carnes procesadas (García *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2005).

Las concentraciones normales de Mn en los alimentos oscilan entre 0,2 µg/g en fuentes pobres en este mineral, como las carnes, productos lácteos y pescado y 20 µg/g en frutos secos como las nueces, los cereales integrales, las semillas de girasol y de sésamo, el salvado y germen de trigo, la yema de huevo, las legumbres y las verduras de

hoja verde, donde se encuentra en elevada proporción. El té y el café también son fuente de manganeso (Cabrera *et al.* 2003; Navarro *et al.*, 2005; Cabrera *et al.* 2006).

Cromo y manganeso ejercen un importante efecto prooxidante en los aceites al igual que el hierro y el cobre (Roca *et al.* 2000; Lendínez *et al.* 2001).

## **Plomo**

El Pb es un contaminante que se encuentra en el medio ambiente, en fertilizantes, plaguicidas y en disolventes empleados en la extracción del aceite y cuyos efectos toxicológicos son bien conocidos (Roca *et al.* 2001).

Este metal es muy empleado en la fabricación de numerosos productos ampliamente utilizados como baterías, pinturas, esmaltes, vidrios, maquinaria de la industria alimentaria, conducciones, aleaciones metálicas, insecticidas, aditivos de gasolinas y otros combustibles, etc. Todos los procesos y operaciones relacionados con la producción y los propios productos, contribuyen a una descarga considerable del elemento al medio ambiente (Cabrera *et al.* 1994; Cabrera *et al.* 1995a; 1995b).

Aunque existen discrepancias entre los distintos autores, la teoría más aceptada considera que la acumulación de Pb en los vegetales se debe principalmente a la polución atmosférica, que supone entre un 73-95% de la carga total de este metal (Dalenberg y Vandriel, 1990), mientras que sólo una pequeña parte corresponde a la absorción del Pb presente en el suelo. Las hojas y los frutos pueden sufrir una contaminación significativa en las inmediaciones de industrias y autopistas, suponiendo un riesgo potencial para el consumidor.

Presenta gran persistencia y una elevada vida media biológica; su acción tóxica se extiende a todo el organismo, si bien el metal se deposita preferentemente en ciertos órganos, como hígado y riñón. El Pb ejerce un efecto tóxico doble sobre el sistema hematopoyético, reduciendo por una parte la vida media de los eritrocitos circulantes, y por otra inhibiendo la síntesis de hemoglobina con la consiguiente aparición de anemia.

Este metal también afecta al sistema nervioso central, asociándose con deficiencias en el desarrollo intelectual de niños expuestos a este contaminante, incluso a concentraciones relativamente bajas; también al tracto gastrointestinal, riñón y a otros sistemas como el endocrino, reproductor, pulmonar, etc. (WHO, 1993).

La dieta sigue siendo una fuente importante de exposición a este metal. Los niños en sus primeros meses de vida son probablemente el grupo de población más sensible al efecto de los metales pesados, y se ha demostrado una correlación elevada entre la

ingestión de plomo procedente de la dieta y la concentración del metal en la sangre. En los adultos, más del 60% del plomo ingerido proviene de los alimentos de origen vegetal, mientras que los productos lácteos aportan casi un tercio. Los moluscos consumidos en grandes cantidades también contribuyen de forma importante.

El Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO-OMS (2007), señala una ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) para el Pb de 25 µg/Kg de peso corporal. Este Comité enfatiza en la necesidad de obtener datos fiables sobre el contenido de Pb en alimentos, mediante un control analítico adecuado.

Debido a su carácter tóxico, la determinación de Pb es importante en cualquier producto alimenticio, incluidos los aceites y las grasas comestibles.

### 3.2.5. Ésteres no glicéridos: ceras

Las ceras son compuestos complejos que actúan como barrera a la pérdida de agua por la evaporación y transpiración de los tejidos vegetales. El análisis de este parámetro se utiliza para detectar la presencia de adulteración con aceites obtenidos por extracción con disolventes.

Químicamente las ceras son ésteres formados a partir de la unión de ácidos grasos ( $C_{20}$ - $C_{28}$ ) y alcoholes grasos de cadena larga ( $C_{27}$ - $C_{32}$ ) (Pérez-Camino *et al.* 2003). Una cera tiene hasta 58 átomos de carbono, lo que influye en sus propiedades físicas como son elevado peso molecular, punto de fusión superior a 70°C y precipitar a temperaturas de 40°C. Las ceras que se encuentran con más frecuencia son las  $C_{40}$ ,  $C_{42}$ ,  $C_{44}$  y  $C_{46}$ , separándose en función del número de átomos de carbono.

Como las ceras se producen mediante una esterificación entre los alcoholes alifáticos presentes en el aceite y los ácidos grasos libres, cuando se produce una hidrólisis de los triacilgliceroles aumenta el contenido de ácidos grasos libres y aumenta la velocidad de la reacción de esterificación. Varios autores han demostrado que se producen cambios en la concentración de ceras en los aceites de forma natural. Así se ha visto que tiene lugar un incremento en el contenido de ceras durante el almacenamiento del aceite de oliva virgen. Este incremento depende de la concentración de las especies reactivas y de las condiciones de almacenamiento (Mariani y Venturini, 1996). De esta manera, una elevada concentración de alcoholes alifáticos también puede provocar con el tiempo un aumento del contenido inicial de ceras.

### 3.2.6. Antioxidantes: compuestos fenólicos y tocoferoles. Capacidad antioxidante total

Desde el punto de vista biológico, un antioxidante se define como una sustancia que, en concentraciones bajas respecto a las de un sustrato oxidable, puede retrasar o evitar su oxidación (Gutteridge *et al.* 2000).

Los radicales libres son entidades químicas que tienen un electrón desapareado o no compartido. A causa de estos electrones, los radicales libres son algo inestables, es decir, son de vida corta; también son altamente reactivos por el hecho de que, para conseguir su estabilidad química, tratan de perder o ganar un electrón.

El antioxidante al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical débil no tóxico. Las “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO) son especies químicas radicales y no radicales que debido a su inestabilidad se comportan como agentes oxidantes. Las ERO se producen endógenamente como consecuencia natural del metabolismo celular, por acción de enzimas tipo oxidasas e hidrolasas y distintas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunológico. La reducción parcial de la molécula de oxígeno puede generar especies reactivas como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales libres superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) e hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ). El óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) y dióxido nítrico ( $NO_2^{\bullet}$ ) son asimismo radicales libres, conocidos como “Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN)”. Cuando la generación de estos compuestos sobrepasa la capacidad antioxidante de los sistemas defensivos se producen lesiones celulares reversibles o irreversibles, denominándose a esta situación “estrés oxidativo”. Las ERO también pueden provenir de fuentes externas como el tabaco, la contaminación ambiental, la radiación ultravioleta, el ozono, etc. (Lajolo *et al.* 2001).

Las ERO atacan a todo tipo de macromoléculas biológicas produciendo la pérdida de su funcionalidad y originando productos tóxicos. Las moléculas más sensibles al daño oxidativo son los AGPI característicos de las membranas celulares. El daño oxidativo a las membranas afecta a su integridad y funcionalidad. Otras moléculas diana de las especies reactivas de oxígeno son las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos. Aunque menos evidentes, los daños producidos en estas macromoléculas tienen también un importante papel en la patogenia de muchas enfermedades, destacando especialmente el daño del DNA en relación al desarrollo del cáncer y del envejecimiento (Lajolo *et al.* 2001).

Existen muchas evidencias de que cada vez es mayor la incidencia de ciertas patologías como consecuencia de una ingesta inadecuada de antioxidantes, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes *mellitus*, enfermedades relacionadas con degeneraciones neurológicas como el Alzheimer, Parkinson, desórdenes autoinmunes y procesos

derivados del envejecimiento celular. Gracias a la presencia de antioxidantes se puede eliminar gran parte de los radicales libres reduciendo por tanto, el estrés oxidativo celular. En el organismo existe un sistema de protección contra las especies reactivas del oxígeno que están implicadas en el daño celular.

El daño oxidativo puede ser prevenido o controlado por una serie de mecanismos defensivos celulares a los que se conoce en su conjunto como “defensa antioxidante”. Se pueden distinguir tres tipos de mecanismos:

**a) Secuestro de iones metálicos:** Como se ha considerado anteriormente, se necesita la presencia de iones de cobre o hierro para que se forme el radical hidroxilo, que es quién comienza el daño oxidativo. Estos iones se encuentran en muy baja concentración a nivel celular porque están secuestrados por proteínas y mantenidos, por tanto, en forma inactiva. Entre estas proteínas merecen destacarse la transferrina y la ferritina para el hierro y la albúmina para el cobre.

**b) Enzimas:** Existen varios sistemas enzimáticos que pueden eliminar alguna de las ERO. Como ya se ha comentado, el radical superóxido puede ser transformado en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa, aunque ello no supone la pérdida de poder oxidante, dada la gran reactividad del peróxido de hidrógeno. Sobre este último compuesto actúan fundamentalmente dos tipos de enzimas: catalasa y glutatión peroxidasa. La primera actúa sobre todo en los peroxisomas, que son la fuente principal del peróxido de hidrógeno. La glutatión peroxidasa necesita el concurso del glutatión reducido, está ampliamente distribuída en la célula y puede actuar también sobre los peróxidos lipídicos. Esta enzima puede actuar igualmente sobre el óxido nítrico y el peroxinitrito. El óxido nítrico, además, puede pasar a nitrato, que es una forma estable, mediante la acción de la oxihemoglobina. Al contrario de lo que ocurre con las demás especies reactivas, el radical hidroxilo no puede ser eliminado por mecanismos enzimáticos y sólo puede ser inactivado por antioxidantes.

**c) Antioxidantes:** existen muchas moléculas que pueden reaccionar directamente con las especies reactivas de oxígeno eliminándolas del medio e impidiendo, por tanto, su acción agresiva sobre las macromoléculas celulares. Entre estos “secuestradores no enzimáticos” destacan las vitaminas antioxidantes C y E, y el propio glutatión, que actúa en este caso sin intervención enzimática. Otro grupo de antioxidantes son los carotenoides y los compuestos fenólicos. Debido a que los antioxidantes endógenos no son suficientes para reducir el estrés oxidativo celular, se requiere la ingesta de antioxidantes exógenos presentes en los alimentos, que en cantidades muy pequeñas son capaces de ejercer una potente acción.

Hoy día se conocen más de 10.000 compuestos distintos con capacidad antioxidante que se localizan principalmente en hortalizas y verduras, semillas y aceites de semillas, frutas y bebidas como el vino y la cerveza. En numerosos estudios epidemiológicos se ha demostrado que un mayor consumo de frutas y productos vegetales disminuye en un 50% el riesgo de ciertos cánceres digestivos, del cáncer de mama por modular la reacción de los estrógenos, el desarrollo de la aterosclerosis por hacer las LDL menos susceptibles a la oxidación a la vez que reduce la producción de moléculas de adhesión e inhibe la agregación plaquetaria (Gerster, 1995; Jampol y Ferris, 2001; Park *et al.* 2003; Le Core *et al.* 2004; Ramírez y Quiles, 2005).

### **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos comúnmente referidos como polifenoles, son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por grupos hidroxilo. Hay más de 8.000 estructuras fenólicas que han sido identificadas, existiendo desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados. Aunque los compuestos fenólicos están presentes en los alimentos, su nivel de ingesta varía enormemente según el tipo de dieta consumida (Ramírez y Quiles, 2005).

Los polifenoles no pueden ser sintetizados por el organismo y se deben ingerir a través de la dieta. Estos antioxidantes presentan propiedades relevantes para la salud humana entre ellas, actuar como antirradicales libres, antimutagénicas, anticarcinogénicas, retardan la senescencia, antiaterogénicas, antimicrobianas, facilitan la circulación sanguínea, antiinflamatorias y fortalecen el sistema inmune (Ziller, 1996; Hernández y Prieto, 1999).

Son muchos los estudios que han mostrado una asociación inversa entre el consumo de compuestos fenólicos y las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Entre los mecanismos de acción de estos compuestos se encuentran la inhibición de la oxidación de las LDL, y una menor agregación y adhesión plaquetarias. Estudios recientes sugieren que los compuestos fenólicos tienen actividad antitrombogénica al reducir la síntesis de sustancias protrombóticas y también de mediadores proinflamatorios, disminuyendo así la expresión de moléculas de adhesión, y modulando la producción de óxido nítrico por el endotelio, generando vasodilatación (Ramírez y Quiles, 2005). El efecto antioxidante de los ácidos fenólicos y sus ésteres depende del número de grupos hidroxilo en la molécula.

Si bien el contenido total en polifenoles es superior en el aceite de oliva virgen, el aceite de argán virgen contiene una cantidad mayor de ácido ferúlico (3470 frente a 51 µg/Kg de aceite, respectivamente) (Khallouki *et al.* 2003). Este ácido es más efectivo como

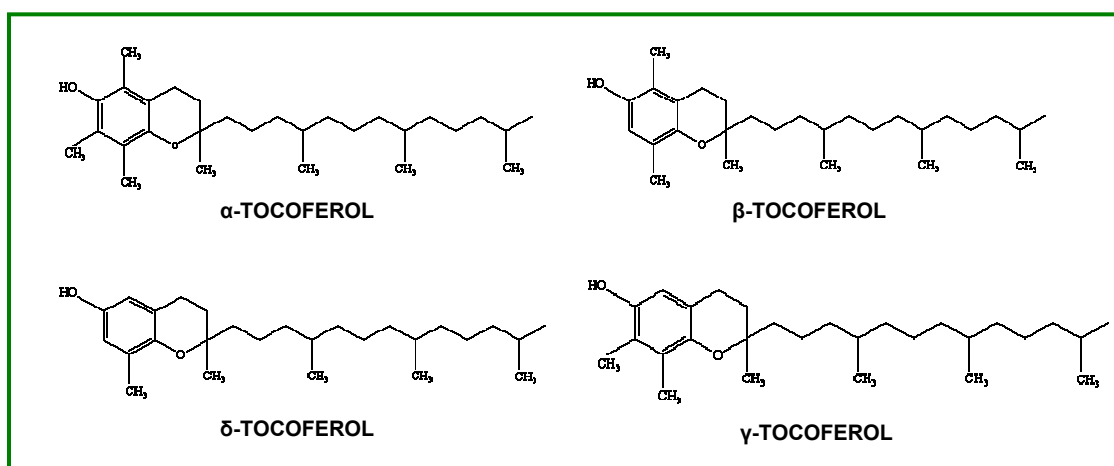


antioxidante que el ácido ascórbico y otros ácidos fenólicos como el ácido *p*-cumárico. El aceite de argán, también contiene otro ácido fenólico importante que es el ácido siríngico, del que Chen *et al.* (2004) encuentran concentraciones de 68 µg/Kg. Este compuesto antioxidante protege contra la oxidación a las LDL. En este sentido, Castelluccio *et al.* (1996) han descrito que después de la incubación de las LDL con ácido ferúlico, un 14% de éste es incorporado en su molécula y un 86% permanece en la fase acuosa, ejerciendo dicho efecto antioxidante.

El contenido fenólico en los aceites, está influenciado por varios factores, tales como las condiciones climáticas, características de la tierra de cultivo, almacenamiento y la tecnología utilizada en su obtención (Gimeno *et al.* 2002; Van der Sluis *et al.* 2005).

## Tocoferoles

El término “vitamina E” se utiliza a menudo para referirse a todos los tocoferoles, pero estrictamente hablando, sólo debería aplicarse al  $\alpha$ -tocoferol. El  $\alpha$ -tocoferol es la forma más abundante en la naturaleza y la de mayor actividad biológica (Mataix y Carazo, 1995; Ahn, *et al.* 1997; Viola 1997). Existen cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles en las formas alfa, beta, gamma y delta para ambos isómeros, y se determina por el número de grupos metílicos en el anillo cromático (**Figura 22**) (Ramirez y Quiles, 2005). Estos compuestos presentan elevada inestabilidad frente a los tratamientos térmicos y en el proceso de refinado desaparecen parcialmente (Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008).



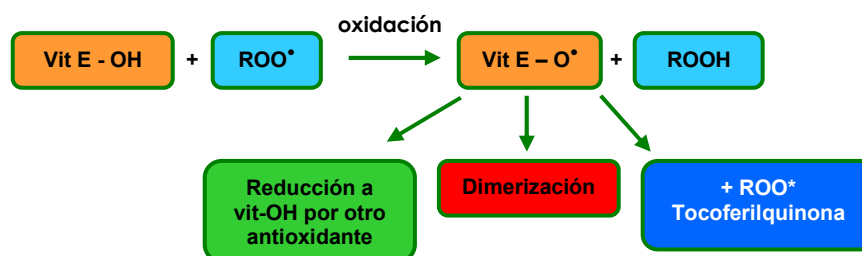
**Figura 22.** Estructura química de los tocoferoles.

Los tocoferoles son muy apolares y se localizan en la fase lipídica de los alimentos. Su actividad biológica en los alimentos depende de la proporción de los distintos isómeros. El  $\alpha$ -tocoferol constituye un importante elemento estabilizador en los procesos

de oxidación, pues protege los ácidos grasos de las membranas frente a los daños causados por los radicales libres (Elliot, 1999). En cuanto a las formas  $\gamma$ ,  $\beta$  y  $\delta$  de los tocoferoles, se ha descrito que su poder antioxidante en el aceite es en orden decreciente:  $\delta > \gamma \approx \beta > \alpha$  (Espín *et al.* 2000; Valavanidis *et al.* 2004). Las actividades biológicas (en relación a  $\alpha$ -tocoferol) del  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol son del 30%, 15% y 1%, respectivamente (**Tabla 3**).

<b>Tabla 3.</b> Grados de actividad de los cuatro tipos de tocoferoles.		
Tipos	Actividad biológica	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> (resistencia a la oxidación)
$\alpha$ -tocoferol	Máxima	Baja
$\beta$ -tocoferol	Intermedia	Intermedia
$\gamma$ -tocoferol	Escasa	Intermedia
$\delta$ -tocoferol	Intermedia	Máxima

La vitamina E es capaz de neutralizar los radicales libres mediante una reacción de oxidación en la que el grupo hidroxilo del anillo de cromanol, cede un H al radical libre. La vitamina E, queda en forma radicalaria y puede reaccionar con otro radical libre, puede ser inactivada hacia una quinona estable o puede volver a regenerar su forma activa por la acción de otros antioxidantes como la vitamina C o el glutatión.



Los AGPI con 2 o más dobles enlaces, son muy abundantes en todas las membranas y ejercen un papel muy importante en su fluidez y funcionamiento. Sin embargo, son muy susceptibles a ser oxidados por los radicales libres. La mayor parte de la vitamina E del organismo se encuentra en dichas membranas celulares, donde tienen un papel de protección frente a la oxidación de los AGPI. Si se produce un radical libre, la vitamina E estabiliza dicho radical y previene que se propague la reacción de oxidación a lo largo de toda la membrana. Existe una relación y colaboración entre la vitamina E y otros compuestos y/o sistemas antioxidantes en el organismo. La relación más directa es con la vitamina C, que sirve para regenerar a la vitamina E, al igual que el glutatión, con la colaboración de aminoácidos azufrados.

Los tocoferoles se encuentran principalmente en las semillas oleaginosas, aunque también en hojas y otras partes verdes de las plantas. Como fuentes alimentarias pueden citarse los aceites vegetales comestibles (soja, maíz, oliva, semilla de algodón y cártamo), los productos derivados de estos aceites (margarina y mayonesas), el germen de trigo, las nueces, frutos secos y los cereales integrales, ya que esta vitamina se concentra en el germen de la semilla. No obstante, existen diversos factores como la luz (concretamente la radiación ultravioleta), el oxígeno del aire, el pH alcalino, el calor y la presencia de ciertos cationes como Fe y Cu, que pueden acelerar los procesos de oxidación de esta vitamina. Existe una correlación importante entre el contenido en vitamina E de los aceites vegetales y su grado de insaturación. En la **Tabla 4** se recogen algunos alimentos ricos en vitamina E.

<b>Tabla 4.</b>	
<b>Alimentos ricos en vitamina E (Fuente: Ramírez y Quiles, 2005).</b>	
<b>Alimento</b>	<b>mg/100 g de porción comestible</b>
Aceite de germen de trigo	215
Pepitas de girasol	49
Aceite de girasol	48
Aceite de hígado de bacalao	21
Aceite de oliva virgen	20
Mayonesa	17
Harina de maíz	13
Nueces, pistachos, cacahuetes	8
Margarina	8
Atún, bonito, caballa en aceite	7

La vitamina E presenta las siguientes propiedades y funciones fisiológicas:

- a) Es un antioxidante muy efectivo en la protección de los ácidos grasos insaturados y otras sustancias fácilmente oxidables. Esta función se ejerce tanto *in vitro* (sobre las grasas, aceites y emulsiones grasas alimenticias) como *in vivo* (protegiendo los lípidos de las membranas y las lipoproteínas de la peroxidación).
- b) Los tocoferoles actúan en el organismo estabilizando otras vitaminas evitando su oxidación, en particular la vitamina A, así como hormonas y enzimas.
- c) Estabilización de membranas biológicas. La vitamina E protege la membrana celular, de los efectos de la peroxidación lipídica producida por los radicales libres. El efecto estabilizador de la membrana puede ser independiente de su actividad antioxidante.
- d) Mantenimiento de la estabilidad de las membranas de los eritrocitos y también en el proceso de la agregación plaquetaria. La vitamina E modula de forma positiva la síntesis de fosfolipasa A2 y de ciclooxigenasa, el aumento de

estas dos enzimas que regulan el metabolismo del ácido araquidónico explican el que la vitamina E favorezca la liberación de prostaciclina, potentes vasodilatadores e inhibidores de la agregación plaquetaria.

e) Efecto sobre actividades enzimáticas. La vitamina E puede inhibir la actividad de la creatinina kinasa y xantina oxidasa, y puede contribuir a proteger varias enzimas de la membrana celular contra la oxidación.

De estas propiedades de la vitamina E se deriva su implicación en la prevención de distintos procesos patológicos, tales como:

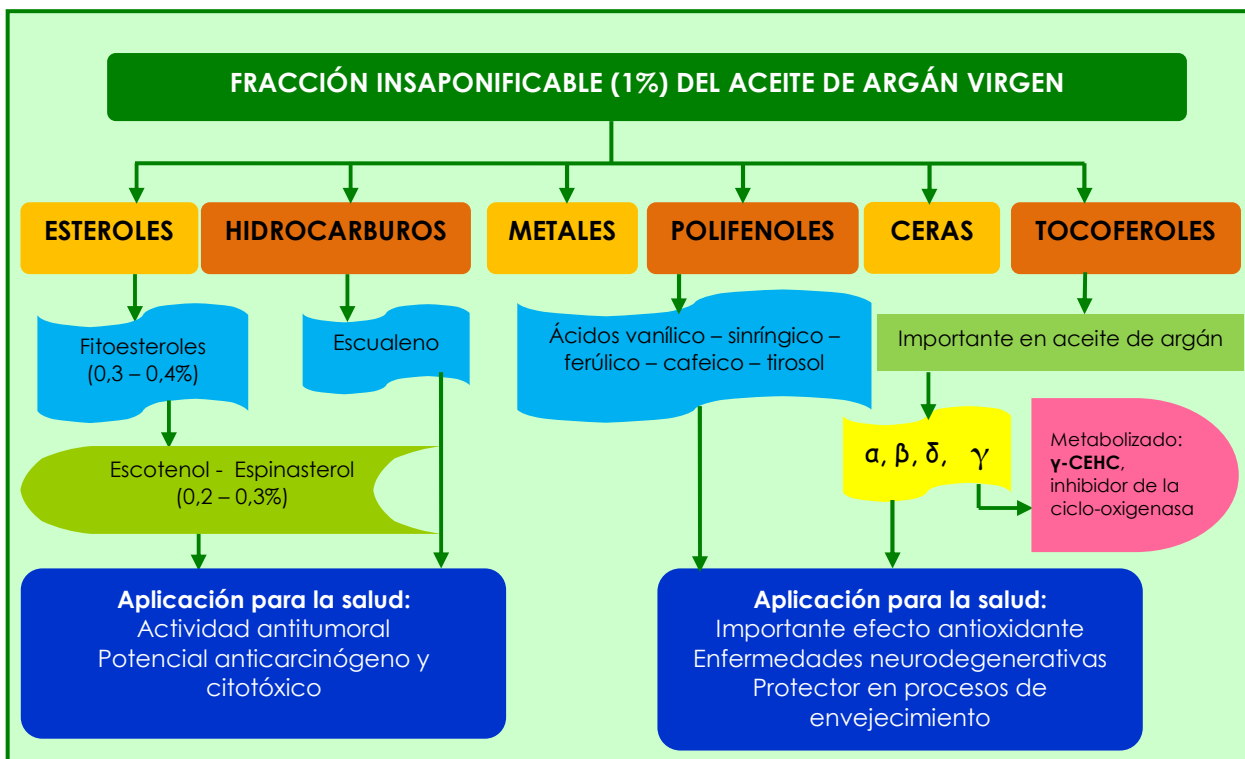
- Cataratas y otros problemas oculares.
- Cáncer.
- Diabetes.
- Alteraciones en la respuesta inmunológica.
- Enfermedad de Alzheimer.
- Fibroplasia retrolenticular en lactantes.
- Anomalías funcionales y morfológicas del sistema neuromuscular (Ramírez y Quiles, 2005).

Estudios recientes han demostrado importantes propiedades del  $\gamma$ -tocoferol, forma predominante en el aceite de argán, para la salud humana, no compartidas por el  $\alpha$ -tocoferol. Las cualidades que diferencian a ambas formas son resultado de su distinta reactividad química, metabolismo y actividad biológica. El  $\gamma$ -tocoferol parece ser más efectivo en la neutralización de ERO que el  $\alpha$ -tocoferol, siendo capaz de proteger contra radicales libres nitrogenados (Cooney *et al.* 1993) e inhibe los peroxinitritos, una forma de nitrógeno particularmente peligrosa (Christens *et al.* 1997), mientras que el  $\alpha$ -tocoferol no presenta esta acción. Los radicales libres nitrogenados desempeñan un importante papel en enfermedades asociadas con la inflamación crónica, incluyendo el cáncer, enfermedad cardíaca y desórdenes degenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Gao *et al.* 2002; Huang *et al.* 2003).

El  $\gamma$ -tocoferol, que muestra una absorción inferior al isómero  $\alpha$ , se acumula de forma significativa en algunos tejidos humanos y se metaboliza hasta 2,7,8-trimetil-2-( $\gamma$ -carboxietil)-6-hidroxicromano ( $\gamma$ -CEHC), que es excretado principalmente por la orina. El  $\gamma$ -CEHC, facilita la excreción de sodio por la orina, lo que puede ser importante fisiológicamente. Tanto el  $\gamma$ -tocoferol, como su metabolito  $\gamma$ -CEHC, inhiben la actividad ciclooxigenasa (COX-2), lo que les confiere propiedades antiinflamatorias (Jiang *et al.* 2000). Algunos estudios en humanos y animales indican que las concentraciones plasmáticas de  $\gamma$ -tocoferol están inversamente relacionadas con la incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Clement *et al.* 1997; Jiang *et al.* 2000; Ramírez y Quiles, 2005).

En un estudio llevado a cabo en Washington, Helzlouer *et al.* (2000) contrastan los efectos del  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y selenio en el cáncer de próstata, encontrando un efecto protector estadísticamente significativo para altos niveles de selenio y  $\alpha$ -tocoferol, solamente cuando los niveles de  $\gamma$ -tocoferol eran altos. Campbell *et al.* (2003) revisan diferentes estudios acerca del papel en la dieta del  $\gamma$ -tocoferol como agente preventivo del cáncer colorectal, encontrando que inhibe la proliferación de las líneas celulares del cáncer de colon de forma más potente que el  $\alpha$ -tocoferol y previene el ciclo de progresión celular, inhibiendo más eficientemente la síntesis de DNA que el  $\alpha$ -tocoferol (Gysin *et al.* 2002).

Numerosos factores influyen en el metabolismo y los niveles tisulares y plasmáticos del  $\gamma$ -tocoferol, como son, el contenido lipídico de la dieta, la inflamación y el estrés oxidativo. Debido a que la mayoría de los estudios clínicos han sido realizados con suplementos de vitamina E sintética en altas cantidades, queda por determinar si estos efectos beneficiosos se producen con el consumo de  $\gamma$ -tocoferol en las cantidades presentes de forma natural en los alimentos (Khallouki *et al.* 2005).



**Figura 23.** Fracción insaponificable del aceite de argán y su importancia para la salud humana.

## Capacidad antioxidante total

Se han desarrollado diferentes métodos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante en alimentos. Se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un compuesto antioxidante. La inhibición es proporcional a la actividad antioxidante de dicho compuesto. Otros ensayos se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo (Morel *et al.* 1993; Pineda-Alonso *et al.* 1999).

Lo ideal sería medir la capacidad antioxidante de cada componente de la muestra a analizar, sin embargo, es difícil determinar su número y concentración. Los métodos propuestos determinan la actividad global o total de todos los compuestos antioxidantes (conocidos o no) presentes en la muestra (Ivekovic *et al.* 2005).

Por otra parte, no existe un método estándar para determinar la capacidad antioxidante en diferentes tipos de muestras. Prior *et al.* (2005) definen una serie de requisitos que debe presentar cualquier método: que sea fácil, con un mecanismo químico y punto final definido, adaptable a ensayos con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos y compatible con diferentes fuentes generadoras de radicales. Otras características son: a) rango analítico apropiado, b) repetibilidad, c) reproducibilidad y d) reconocimiento de sustancias que puedan interferir en el análisis.

Básicamente, existen dos tipos de reacciones en las que se basan los principales métodos *in vitro* propuestos para la determinación de la capacidad antioxidante, como son la transferencia de átomos de hidrógeno, métodos ORAC (Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno) y TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) y la transferencia individual de electrón, métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)} y FRAP (Capacidad de Reducción Férrica del Plasma). Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción (Frankel y Meyer, 2000; Pérez *et al.* 2000; Schwarz *et al.* 2001; Wang *et al.* 2004). La mayoría de estos métodos no emplean especies radicales con significado biológico. Son radicales ajenos al organismo, como el DPPH• o el ABTS•+. El empleo de radicales peroxilo en ensayos como TRAP le añade un mayor significado biológico, ya que estas ERO son las más importantes a nivel fisiológico (Antolovich *et al.* 2002).

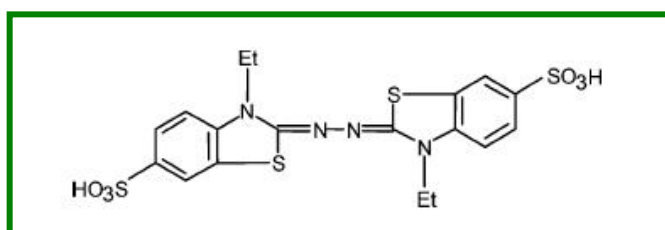
La mayor parte de los métodos de medida de la actividad antioxidante miden solamente compuestos solubles en agua debido a la naturaleza hidrofílica de las especies reactivas y de los sustratos oxidables que emplean. Algunos ensayos pueden adaptarse para medir antioxidantes lipofílicos: ORAC (Aldini *et al.* 2001; Prior *et al.* 2003), ABTS (Alcolea *et al.* 2002) y el ensayo TRAP (Gorinstein *et al.* 2003).

Los resultados obtenidos se expresan en forma de índices o valores equivalentes. Así, en el caso de los métodos ABTS, DPPH y FRAP, se suele emplear el valor TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox), que en aceites vegetales comestibles se expresa usualmente en mmol Trolox/Kg de aceite (Pellegrini *et al.* 2001). El Trolox es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, que se utiliza como estándar antioxidante; es ampliamente usado por ser soluble en fases acuosas y lipídicas.

A continuación se describen los principales métodos aplicados para medir la capacidad antioxidante en aceites vegetales comestibles.

### Método ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)}

El fundamento de este método consiste en generar el radical ABTS<sup>•+</sup> a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (**Figura 24**) y comprobar cómo los antioxidantes son capaces de atrapar este radical (Miller y Rice-Evans, 1993). El radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> es un compuesto de color verde-azulado, con espectro de absorción en el intervalo de ultravioleta-visible, que presenta máximos a 414, 645, 734 y 815 nm. Se forma el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable, al añadir la muestra la concentración del radical disminuye y el color de la reacción desciende a medida que lo hace la concentración del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>, midiéndose entonces el descenso de absorbancia producido.



**Figura 24.** Estructura del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Fuente: Prior *et al.* 2005).

Existen diversas formas de generar el radical ABTS<sup>•+</sup>:

- Enzimáticamente (mioglobina, peroxidasa de rábano).
- Químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo).
- Electroquímicamente.

En un principio, se utilizó el sistema peroxidasa/mioglobina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato de oxidación para estudiar la capacidad antioxidante total del plasma y fluidos biológicos (Rice-Evans *et al.* 1994; Frankel *et al.* 2000); posteriormente, este método ha sido

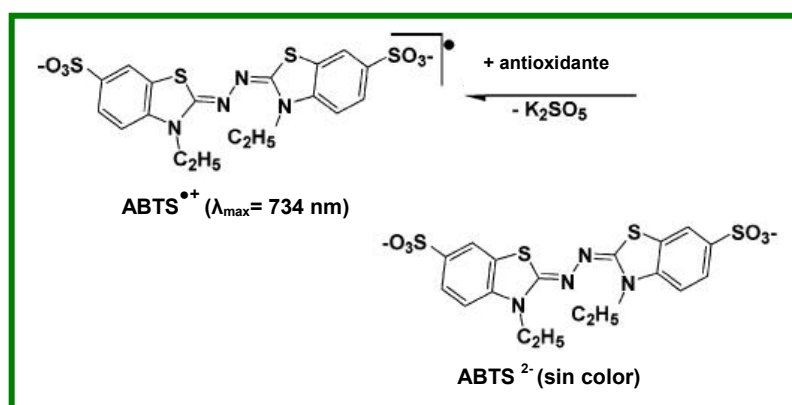
ampliamente aplicado en vinos, té, zumo (Gil *et al.* 2000), tomate (Martínez-Valverde *et al.* 2002) y en aceite de oliva (Gorinstein *et al.* 2003). Presenta varios inconvenientes, como son la necesidad de un estricto control de la temperatura de reacción entre el radical y antioxidante (37°C), interferencias con sustancias con actividad peroxidasa y posible sobreestimación de los resultados.

También el radical catiónico se puede generar enzimáticamente empleando el sistema ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidasa de rábano; es un método fácil y rápido, y no presenta los inconvenientes del método anterior (Villaño *et al.* 2004).

Con dióxido de manganeso, el radical se forma haciendo pasar el ABTS a través de un filtro con dióxido de manganeso, formándose el radical instantáneamente, pero el proceso es muy inestable a temperatura ambiente (Benavente-García *et al.* 2000).

En la oxidación con radicales peroxilo el sustrato se incubaba con un compuesto con estructura "azo". Es un método muy inestable y requiere elevadas temperaturas para la generación del radical (Kim *et al.* 2002).

La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante un tiempo comprendido entre 12 y 16 horas. El ABTS y el persulfato reaccionan estequiométricamente en una relación 1:0,5 por lo que el ABTS no es oxidado completamente. Una vez generado el radical, la medida se realiza como un ensayo de post-adición y se determina la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical (decoloración). Se ha aplicado por ejemplo, en la determinación de la capacidad antioxidante en té (Van-Nederkassel *et al.* 2005), frutas y verduras (Proteggente *et al.* 2002) y aceite de oliva virgen (Samaniego *et al.* 2007). Las **Figuras 25** y **26** esquematizan el fundamento del método ABTS generando el radical con persulfato potásico.



**Figura 25.** Estructura química de la reacción entre ABTS y persulfato potásico (Fuente: Huang *et al.* 2005).



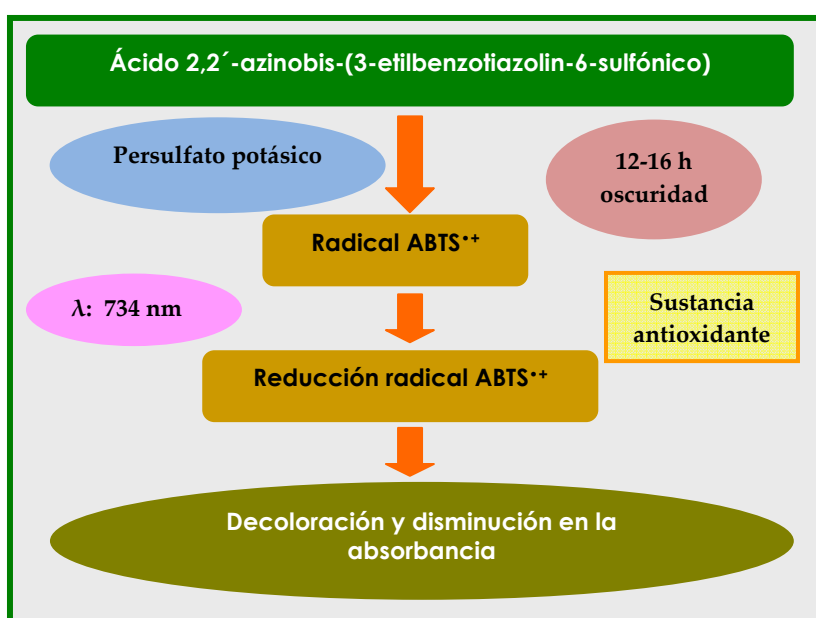
En el método electroquímico, el radical se genera tras oxidación del ABTS con una corriente eléctrica. Presenta ciertas ventajas como son que es un proceso fácil y rápido de realizar, no requiere otros reactivos ni control de la temperatura; por ejemplo, se ha aplicado a vinos tintos y blancos y en té (Alonso *et al.* 2002; Ivekovic *et al.* 2005).

El método más utilizado es con persulfato potásico (Proteggente *et al.* 2002; Prior *et al.* 2005; Van-Nederkassel *et al.* 2005; Samaniego *et al.* 2007). En este caso, el método ABTS<sup>•+</sup> además de elevada reproducibilidad, presenta las siguientes ventajas:

- El radical ABTS<sup>•+</sup> que es generado químicamente, presenta bastante estabilidad y es una alternativa mucho más viable económicamente.
- El radical reacciona rápidamente con los compuestos antioxidantes presentes en la muestra problema, normalmente en unos 30 minutos.
- Puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso.
- Se puede usar en un amplio rango de pH y puede emplearse para estudiar el efecto del pH sobre el mecanismo de acción de los distintos compuestos antioxidantes.

Presenta sin embargo, una serie de inconvenientes:

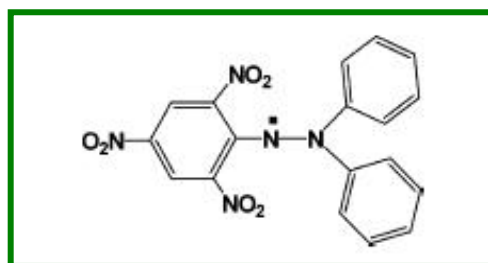
- El ABTS<sup>•+</sup> es un radical artificial que no se encuentra en nuestro organismo.
- Termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el ABTS (0,68 V), como ocurre con algunos compuestos fenólicos.
- El punto final de la reacción varía en función de la sustancia antioxidante.



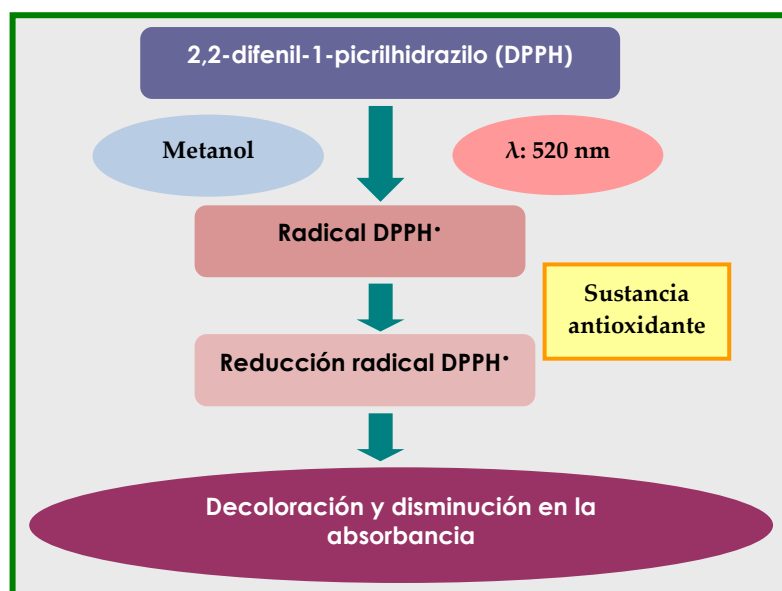
**Figura 26.** Esquema de la reacción producida en el método ABTS<sup>•+</sup>.

## Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El fundamento de este método consiste en determinar la capacidad de los antioxidantes de la muestra para capturar el radical libre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y reducirlo (**Figura 27**). El radical, que muestra un intenso color púrpura, es estable y está disponible comercialmente, lo que reduce el tiempo de análisis al no tener que ser generado antes del ensayo como ocurre con el método ABTS, evitando paralelamente cierta variabilidad en los resultados obtenidos. La decoloración del radical se determina a 520 nm y la cuantificación se realiza empleando disoluciones patrón de ácido ascórbico o de Trolox (**Figura 28**) (Brand-Williams *et al.* 1995). En algunos casos, la interpretación resulta complicada, ya que ciertos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH, por ejemplo los carotenoides (Prior *et al.* 2005).



**Figura 27.** Estructura del DPPH• (Fuente: Prior *et al.* 2005).

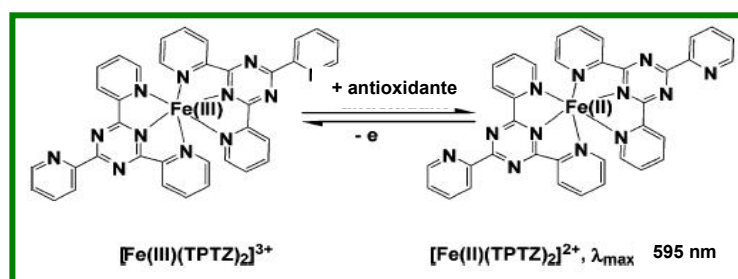


**Figura 28.** Esquema de la reacción producida en el ensayo DPPH.

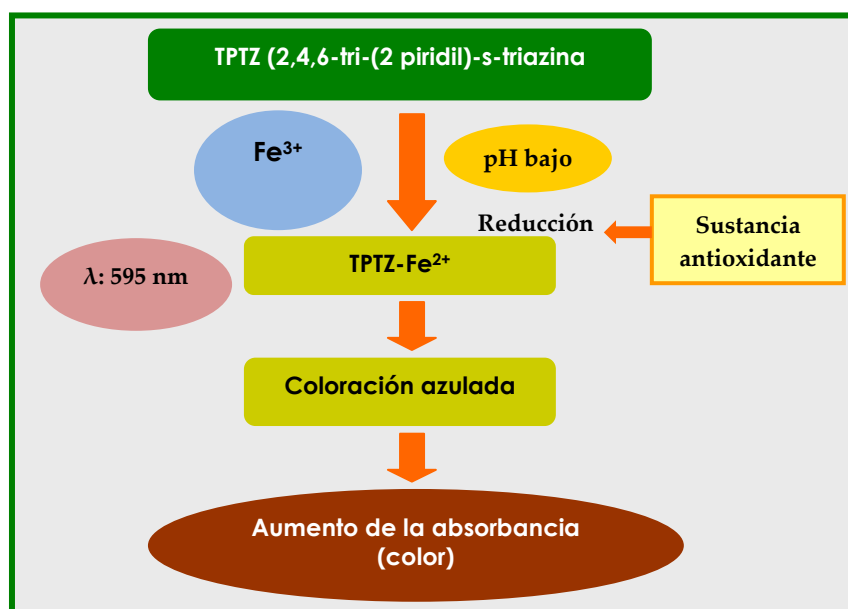
## Método FRAP

El método FRAP propuesto por Benzie y Strain (1996), con algunas modificaciones (Pulido *et al.* 2000), determina la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra. A

pH bajo y en presencia de un reductor, el complejo tripiridiltriazina (TPTZ) con Fe(III) se reduce a forma ferrosa (**Figura 29**), desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 595 nm, que permite ser cuantificado espectrofotométricamente por interpolación en una recta de calibrado utilizando por ejemplo, Trolox como referencia. Se mide el incremento de absorbancia a los 30 minutos de comenzar la reacción. La capacidad de reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. El ensayo FRAP es sencillo y fácilmente automatizable. Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos (**Figura 30**). Sin embargo, en el caso de algunos polifenoles se han descrito reacciones más lentas, llegando incluso a requerir 30 minutos hasta completar la reducción del complejo. La reacción no es específica, y por tanto, cualquier reacción con un potencial redox menos positivo originará la reducción del complejo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ.



**Figura 29.** Estructura química de la reacción de reducción de Fe(III) a Fe(II) (Fuente: Huang *et al.* 2005).



**Figura 30.** Esquema de la reacción producida en el método FRAP.

La **Tabla 5** resume las características de los principales métodos de determinación de capacidad antioxidante total.

**Tabla 5.**  
Descripción de las características más importantes de los distintos métodos de medida de capacidad antioxidante.

Características	Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno			Ensayos de transferencia de electrones		
	<i>TRAP</i>	<i>ORAC</i>	<i>DCFH-DA<sup>b</sup></i>	<i>DPPH</i>	<i>ABTS</i>	<i>FRAP</i>
<i>Especie iniciadora</i>	AAPH <sup>a</sup> (generador radicales peroxilo)	AAPH <sup>a</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Cu <sup>2+</sup> /CuSO <sub>4</sub>	AAPH <sup>a</sup> (generador radicales peroxilo)	Radical DPPH•	Radical ABTS••	
<i>Medida</i>	Oxígeno consumido	Inhibición caída fluorescencia de PE/FL <sup>c</sup>	Inhibición de oxidación de DCFH-DA	Descenso de DPPH•	Descenso de ABTS••	Reducción: TPTZ-Fe <sup>3+</sup> a TPTZ-Fe <sup>2+</sup>
<i>Técnica</i>	Electrodo de oxígeno	Fluorimetría	Espectrofotometría /fluorimetría	Espectrofotometría	Espectrofotometría	Espectrofotometría
<i>Cuantificación</i>	Longitud de fase de retraso	Fl a $\lambda_{extinción}$ 540 y $\lambda_{emisión}$ 565 nm técnica AUC <sup>d</sup>	ABS: 504 nm/ Fl: $\lambda_{extinción}$ 504 $\lambda_{emisión}$ 529 nm Fase de retraso	Absorbancia a 520 nm	Absorbancia a 734 nm	Absorbancia a 595 nm
<i>Expresión de resultados</i>	TEAC	TEAC	TEAC	TEAC	TEAC	TEAC, $\mu$ M Fe(II), $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico
<i>Muestras</i>	Alimentos, muestras biológicas	Alimentos, bebidas, muestras biológicas	Muestras biológicas	Alimentos, bebidas	Alimentos, bebidas, muestras biológicas	Alimentos, bebidas, muestras biológicas
<i>Referencias</i>	Ghiselli <i>et al.</i> 2000	Fernández-Pachón <i>et al.</i> 2005	Valkonen y Kuusi, 1997	Sánchez-Moreno <i>et al.</i> 1997; Samaniego <i>et al.</i> 2007; Romani <i>et al.</i> 2007	Alonso <i>et al.</i> 2002; Van-Nederkassel <i>et al.</i> 2005; Bail <i>et al.</i> 2008	Benzie y Strainn, 1996; Fernández-Pachón <i>et al.</i> 2005

<sup>a</sup>AAPH: 2,2-azinobis(2-amidino propano hidrocloreuro); <sup>b</sup>DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato; <sup>c</sup>PE/FL: ficoeritrina/fluoresceína; <sup>d</sup>Técnica AUC: técnica del área bajo la curva.

## 4. INTERÉS NUTRICIONAL Y TERAPÉUTICO DEL ACEITE DE ARGÁN. OTROS USOS

Durante los últimos 15 años, el estatus del aceite de argán ha ido evolucionando desde una curiosidad exótica para turistas a un preciado aceite de alto valor dietético. Este cambio es consecuencia principalmente de un mayor conocimiento de su composición: altos niveles en AGMI y AGPI cuyo efecto beneficioso sobre los lípidos séricos es indiscutible, además de su riqueza en antioxidantes.

Datos experimentales, epidemiológicos y nutricionales han mostrado que la incidencia de enfermedades cardiovasculares está correlacionada directamente con la ingesta de AGS e inversamente con la de AGPI (Keys *et al.* 1986; Trautwein *et al.* 1999). Además, numerosos estudios han demostrado que productos ricos en componentes tales como los tocoferoles y compuestos fenólicos reducen la susceptibilidad de las lipoproteínas a la peroxidación lipídica (Reaven *et al.* 1993; Awad y Fink, 2000; Mateos *et al.* 2003; Khalloukhi *et al.* 2003).

A continuación se exponen los principales estudios al respecto encontrados en bibliografía.

### ○ **Actividad antioxidante**

Charraouf y Guillaume (1999) observaron en un experimento con ratas, que la ingestión de aceite de argán inducía un cambio en los AGPI de las membranas. Esta acción específica se atribuye a la vitamina E que actúa disminuyendo la susceptibilidad de la membrana a la peroxidación lipídica, que podría ser el origen del proceso de envejecimiento.

Los esteroides vegetales, al igual que la vitamina E, incrementan la resistencia a la oxidación de las LDL (Drissi *et al.* 2004).

La ingesta de compuestos fenólicos, también presentes en cantidad considerable en el aceite de argán, pueden aportar efectos beneficiosos para la salud ya que favorecen el aumento de la capacidad antioxidante en suero (Sociedad Española de Dietética y Ciencia de la Alimentación, 2006).

### ○ **Agente hipocolesterolémico**

La prevalencia de la morbilidad y mortalidad por enfermedades coronarias es particularmente baja en regiones mediterráneas, donde la dieta tradicional, que es

rica en aceite de oliva, proporciona una fuente importante de AGMI. El tipo de grasa consumida en la dieta influye en los niveles lipídicos sanguíneos y consecuentemente, en el riesgo de desarrollar aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Pérez-Jiménez, 2005).

Se ha comprobado en diversos estudios que el consumo de aceite de argán protege contra el proceso de aterosclerosis y reduce el riesgo cardiovascular asociado a las LDL y los niveles lipídicos en sangre (Cherki *et al.* 2003; Cherki *et al.* 2005; Derouiche *et al.* 2005).

Berrougui *et al.* (2004) señalan que el tratamiento de individuos hipertensivos con aceite de argán, no sólo previene el incremento de la presión sanguínea, sino que también mejora la función endotelial.

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de argán protegen de la peroxidación a las LDL desempeñando un papel clave para prevenir la aterosclerosis. También pueden prevenir la trombosis, inhibiendo la agregación plaquetaria, la permeabilidad y fragilidad capilar (Sociedad Española de Dietética y Ciencia de la Alimentación, 2006).

Otros compuestos minoritarios de la fracción insaponificable, como son los esteroides, pueden estar implicados en la acción hipocolesterolemica de este aceite (Khallouki *et al.* 2003). Efectivamente, la estructura molecular de estos esteroides vegetales es muy similar a la del colesterol humano y por lo tanto, su consumo reduce la absorción del colesterol ya que compiten con éste (Plat y Mensink, 2001; Ostlund *et al.* 2002). Ensayos clínicos han demostrado que el incremento de la cantidad de esteroides ingeridos en la dieta modula positivamente el perfil lipídico sanguíneo (Plat y Mensink, 2005).

Berrada *et al.* (2000) y Berrougui *et al.* (2003) comprueban una mejoría del perfil lipídico en la hiperlipemia inducida en ratas mediante el tratamiento prolongado con aceite de argán. En ambos estudios, se observó una disminución significativa en el colesterol total, en LDL y en el peso corporal. El incremento en la concentración de HDL no fue significativo. Estos datos han sido confirmados en humanos (Drissi *et al.* 2004; Derouiche *et al.* 2005). Drissi *et al.* (2004) concluyen que, en adultos sanos procedentes del suroeste de Marruecos, el consumo regular de aceite de argán (15 g/día) se asocia con una disminución significativa en los niveles plasmáticos de las LDL en comparación con sujetos sanos que viven en la misma zona pero no consumidores de este aceite.

Con el propósito de investigar los efectos anti-hipertensivos y su mecanismo de acción, Berrougui *et al.* (2004) llevan a cabo otro estudio empleando una dieta rica

en aceite de argán (10 mL/Kg) en ratas jóvenes no hipertensivas de 4 semanas de edad. Después de 7 semanas de tratamiento, se reduce significativamente la presión sanguínea en las ratas mediante el incremento de la respuesta endotelial, disminuyendo la liberación de tromboxano A<sub>2</sub> y los marcadores de estrés oxidativo.

#### ○ **Acción anticancerígena**

Aunque los datos sobre la incidencia de cáncer en países africanos son escasos y relativos sólo a determinadas regiones, es evidente que la dieta de este continente, que es especialmente rica en productos vegetales, aporta propiedades que pueden prevenir el cáncer en sus habitantes. La incidencia de cáncer de colon o de mama, es mucho más baja que en Europa occidental y Norte de América (Khallouki *et al.* 2003).

La peroxidación lipídica debida a la producción de radicales libres, se considera la principal causa de mutagenesis, carcinogénesis, enfermedad cardiovascular y del envejecimiento celular. Se cree que los antioxidantes previenen o retardan la aparición de estos procesos (Khallouki *et al.* 2003).

El aceite de argán es una rica fuente de antioxidantes fenólicos, ácido caféico y oleuropeína junto con los  $\Delta^7$ -esteroles, escotanol y espinasterol (Khallouki *et al.* 2003). Los esteroles mayoritarios del aceite de argán son relativamente raros y no se presentan en otros aceites vegetales; así, el escotanol presenta potencial anticarcinogénico y el espinasterol tiene efectos antitumorales y anticolesterolémicos (Khallouki *et al.* 2003 y Maurin, 1992).

Otra sustancia con propiedades anticancerígenas presente en este aceite es el escualeno que, en comparación con otros aceites, se encuentra en altas concentraciones (310 mg/100 g); actúa como protector frente al cáncer de piel y además aumenta la excreción de xenobióticos en ratas y ratones (Khallouki *et al.* 2003).

Datos epidemiológicos y experimentales sugieren que el  $\gamma$ -tocoferol puede ser un agente antioxidante y quimiopreventivo más potente que el  $\alpha$ -tocoferol (Jiang *et al.* 2000; Gao *et al.* 2002; Huang *et al.* 2003). Por ejemplo, se ha encontrado que el  $\gamma$ -tocoferol posee una interacción más potente frente a la especie reactiva del óxido de nitrógeno (NO) que el  $\alpha$ -tocoferol (Cooney *et al.* 1993).

Un estudio llevado a cabo por Cherki *et al.* (2006), demuestra el efecto antiproliferativo de los tocoferoles y saponinas extraídas del árbol de argán en líneas celulares de cáncer de próstata hormona-dependientes y hormona-

independientes. Bennani *et al.* (2007), en otro estudio realizado en líneas celulares prostáticas humanas, pero utilizando extractos de polifenoles y esteroides de aceite de argán virgen, evidencian el efecto antiproliferativo sobre las líneas celulares cancerígenas. Los datos obtenidos sugieren que el aceite de argán constituye un potencial interesante en el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención del cáncer de próstata.

#### ○ **Uso en cosmética**

Este aceite tradicionalmente está indicado para curar todo tipo de granos en la piel y más particularmente, el acné juvenil y marcas de varicela. También se recomienda para reducir problemas de piel seca y retrasar la aparición de arrugas (Charrouf y Guillaume, 1999).

Los beneficios que produce este aceite en la piel son:

1. Induce un cambio en los AGPI de las membranas celulares y promueve un incremento de la actividad antioxidante de la célula. Esta acción específica ha sido atribuida a la elevada concentración de tocoferoles.
2. Restauración de la capa acuoso-lípida e incremento del aporte de nutrientes a las células de la piel.
3. Estimulación de la oxigenación intracelular.
4. Neutralización de radicales libres y protección del tejido conjuntivo.
5. Reduce la grasa cutánea y mejora la apariencia de la piel (Charrouf, 1995; Drobev, 2007).

Algunos laboratorios franceses como Galenic, Yves Rocher y la sociedad Colgate-Palmolive, han efectuado un intenso estudio al respecto e incorporado el aceite de argán como ingrediente en la formulación de diversos productos cosméticos (Charrouf, 1995).

**Figura 31.** Productos de cosmética que utilizan el aceite de argán como ingrediente (Fuente: Capriflavors, 2006).







Figura 32. Efectos beneficiosos del consumo de aceite de argán y principales compuestos responsables.

## 5. ÁCIDOS GRASOS Y TOCOFEROLES COMO AGENTES ANTIINFLAMATORIOS INTESTINALES

### 5.1. Enfermedad inflamatoria intestinal

La denominación enfermedad inflamatoria intestinal (EII) engloba una serie de trastornos multisistémicos de etiología desconocida, caracterizados por una inflamación recurrente del tracto gastrointestinal y cuyos cuadros clínicos más representativos son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). No obstante, la EII incluye también un pequeño grupo de enfermedades que se caracterizan por una afectación inflamatoria del intestino como la colitis microscópica, la colitis colagenosa y la colitis pseudomembranosa, además de colitis infecciosas de diversa índole (Obrador y Riera, 1994).

Tanto la CU como la EC presentan síntomas clínicos comunes como dolor abdominal, diarrea y pérdida de peso, aunque también poseen claras diferencias en cuanto a la distribución de las lesiones que causan. Así, la CU afecta a las capas más superficiales del intestino grueso (mucosa y submucosa) (Obrador, 1994), las lesiones comienzan en el recto y se extienden hacia la zona proximal de manera continua. La EC en cambio, puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, aunque se presenta más comúnmente en el íleon terminal y en el colon proximal. El daño afecta a todo el grueso de la pared del intestino, llegando a producir perforaciones, estenosis y fístulas con órganos adyacentes (Gassull, 1994). En los dos casos se encuentran características histológicas muy similares a nivel de la mucosa, lo cual dificulta su diagnóstico. La presencia de granulomas constituye el único carácter patognomónico frente a la CU, pero tan sólo se detectan en el 25% de las biopsias y no son específicos de la EC, ya que se han observado también en otras enfermedades como la tuberculosis colónica y la esquistosomiasis.

#### 5.1.1. Epidemiología

La incidencia de la EII varía mucho en cada área geográfica y entre diferentes poblaciones. Se calcula que de aproximadamente 400 millones de europeos, unas 850.000 personas padecen EC y 1.000.000 padecen CU (Loftus y Sandborn, 2002). En Asia y América del Sur la EII es poco frecuente (Royero, 2003).

Aunque la prevalencia de la EII está empezando a estabilizarse en áreas de alta incidencia como el norte de Europa y de América, continúa aumentando en zonas de baja incidencia como Asia, el sur de Europa y otros países en vías de desarrollo (Loftus,

2004). En España, varios estudios prospectivos poblacionales han mostrado una frecuencia variable (8-16 casos por 100.000 habitantes/año) (Brullet *et al.* 1998; López *et al.* 1999; Saro *et al.* 2000).

La EII se presenta con más incidencia en individuos de raza blanca y a edades tempranas. La EC tiene una mayor incidencia en mujeres que en varones, mientras que la CU afecta por igual a ambos sexos. En cuanto a la edad, en la CU se observa un pico de máxima incidencia entre los 30 y 35 años y otro menos importante entre los 60 y 65 años, mientras que en la EC la máxima incidencia está entre los 15 y 25 años, con un segundo pico menos relevante entre los 60 y 65 años (Stowe *et al.* 1990).

### 5.1.2. Etiología

La causa de estas enfermedades se considera desconocida, aunque existen una serie de factores que inciden tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de las mismas (Figura 33).

#### Factores ambientales

El **tabaco** se presenta como un factor protector para la CU y un factor de riesgo para la EC, siendo la asociación entre tabaco y EC más frecuente entre las mujeres. Los mecanismos por los cuales fumar afecta a la frecuencia y evolución de la CU y la EC son desconocidos, aunque la nicotina parece poseer cierto efecto antiinflamatorio (Sykes *et al.* 2000). Los efectos agravantes del humo del tabaco sobre la colitis se han atribuido asimismo a la nicotina, a partir de datos obtenidos en un modelo experimental de colitis en ratas. Un bloqueante de los receptores nicotínicos, el hexametonio, actúa previniendo los efectos nocivos de la exposición al humo de tabaco (Galeazzi *et al.* 1999).

La **dieta** ejerce una influencia destacable en la EII, como cabe esperar de una enfermedad que afecta al tubo digestivo. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que los cambios en la composición de la dieta pueden afectar a la respuesta inmunológica. Concretamente, los lípidos son uno de los sustratos que más afectan a la modulación de la inmunidad. La composición de los lípidos de las membranas celulares puede variar según la dieta, y esto influye en la síntesis de eicosanoides y en la respuesta celular (Gassull, 2004; Gassull *et al.* 2005).

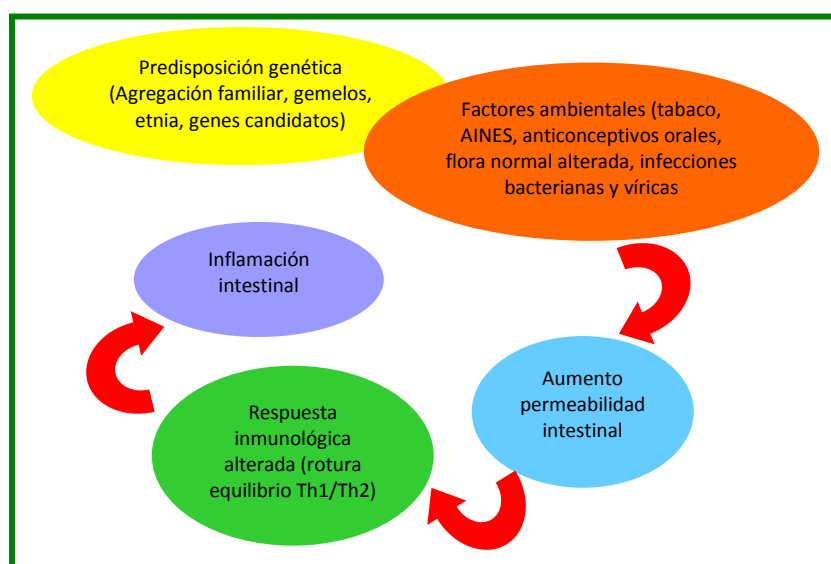
El **estrés** está también asociado con la EII, pero más como un agente modificador que inductor, y su papel es más obvio en modelos animales que en humanos. Así, existen estudios que relacionan el estrés psicológico duradero con un aumento de exacerbación de los síntomas de la enfermedad (Levenstein *et al.* 2000).

## Factores genéticos

Se sabe que el factor genético por sí solo no es suficiente para provocar EII. Sin embargo, los parientes en primer grado de los enfermos de Crohn o colitis ulcerosa tienen una probabilidad mucho mayor que la población general de presentar la enfermedad (Orholm *et al.* 2000). Dentro de familias con múltiples casos de EC, existen además patrones comunes en cuanto a las características de la enfermedad. Esto sugiere que ciertos factores genéticos o ambientales compartidos por los miembros de una misma familia determinan el curso de la patología (Cho, 2004; Halme *et al.* 2006).

## Flora bacteriana

Existe cada vez más certeza de que la presencia de ciertas bacterias, no forzosamente patógenas *per se*, es determinante para el desarrollo de la inflamación. De hecho, se ha comprobado la eficacia clínica del uso de antibióticos de amplio espectro y de prebióticos en algunos grupos de pacientes (Sutherland *et al.* 1991; Turunen *et al.* 1998; Rembacken *et al.* 1999). En investigaciones desarrolladas en los últimos diez años, llama la atención que en diversos modelos experimentales de EII, incluyendo animales transgénicos, la enfermedad no se manifiesta en ambiente libre de patógenos, pero sí en presencia de microbiota normal (Aranda *et al.* 1997). En el intestino existe un estado que se ha definido como “inflamación fisiológica”, es decir, de cierto estado de inactivación leucocitaria mayor que en otros tejidos pero con tolerancia a los antígenos presentes en el lumen intestinal, mayoritariamente de origen bacteriano. En la EII esta tolerancia parece disiparse, al menos en parte. La respuesta inflamatoria depende de la presencia de antígenos en el lumen y está mediada por linfocitos T, aunque se desconoce la identidad de las bacterias que podrían influir en el desarrollo de la enfermedad (Davidson *et al.* 1995).



**Figura 33.** Interrelación de los diferentes componentes implicados en la etiopatogénesis de la EII.

### 5.1.3. Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal

En el lumen intestinal hay productos que provienen de la dieta, además de un gran número de bacterias que generan muchos productos bacterianos, como el muramildipéptido y los lipopolisacáridos. Entre las funciones del intestino está la de distinguir cuales de estas sustancias son patógenas y cuales deben ser toleradas. Para interactuar con estos productos y con las bacterias y, reconocer las comensales y las patógenas, las células del epitelio intestinal poseen dos formas de reconocimiento: los *toll-like receptors* (TLRs), que son moléculas superficiales, y la familia de los NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), que son receptores intracelulares. Por otra parte, en situaciones patológicas se puede dar un incremento en la permeabilidad intestinal que favorecerá el paso de antígenos a través de la barrera intestinal, propiciando su reconocimiento por parte de las células presentadoras de antígenos (*antigen presenting cells: APC*), principalmente macrófagos y células dendríticas. Estas células ingieren los antígenos exógenos, los procesan y los presentan en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (**Figura 34**).

Las células T cooperadoras (*T helper*) poseen moléculas en su superficie capaces de reconocer los antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos, lo que activa la diferenciación de estos linfocitos. Así pues, las células T cooperadoras vírgenes (Th0) una vez activadas tienen la posibilidad de diferenciarse en tres tipos distintos de células Th: Th1, Th2 o TH17. Las primeras se caracterizan por producir interleuquina-2 (IL-2) e interferon gama, mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL10 y las Th17 producen característicamente IL-17. La elección de una u otra opción depende de varios factores entre los que destacan las citoquinas producidas por macrófagos y células dendríticas como consecuencia de la interacción con los distintos antígenos, las cuales a su vez dependen en buena medida del antígeno implicado.

Además de las células cooperadoras (Th1, Th2, Th17), la homeostasis intestinal se mantiene gracias a la acción de células T reguladoras. Incrementos o alteraciones en la población de células efectoras o disminución en la de células T reguladoras pueden dar lugar a la inflamación de la mucosa.

El hecho de que el intestino esté en contacto continuo con la flora bacteriana hace necesaria la existencia de mecanismos de control que eviten una respuesta desproporcionada. Así, en individuos normales, la estimulación del sistema inmune por parte de las bacterias presentes en el lumen intestinal o de productos que provienen de la dieta da lugar a la activación de linfocitos T vírgenes intraepiteliales y de *lamina propria* y a su diferenciación a células Th2, lo que conlleva que en la mucosa normal la respuesta inmune sea controlada por las citoquinas antiinflamatorias y reguladoras (IL-10, IL-4, IL-5, TGF $\beta$ ) producidas por macrófagos y linfocitos Th2. Concretamente, la IL-10, producida por células Th2 tiene una potente actividad natural antiinflamatoria que

bloquea o inhibe la tendencia hacia la respuesta Th1. Es necesario indicar que las vías Th1 y Th2 se inhiben mutuamente con las consecuencias obvias para la inflamación.

En enfermos con EII especialmente en la EC, por causas que aún se desconoce, estos mismos estímulos conducen a la liberación de IL-12, IL-18 y factor de necrosis tumoral (TNF) por las células presentadoras de antígenos, y como consecuencia a la activación de linfocitos vírgenes y a su diferenciación hacia Th1. Así pues en pacientes con EC se han encontrado aumentados los niveles de IL-12 e IL-18 (te Velde *et al.* 2003), así como los de interferón gamma (IFN $\gamma$ ), cuya liberación estimulan (Breese *et al.* 1993; Podolsky, 2002). Las células Th1 activadas, liberan a su vez citoquinas, lo que tiende a ampliar y reforzar la respuesta. Por otra parte, se ha sugerido la existencia de deficiencias en células T reguladoras en individuos con EC.

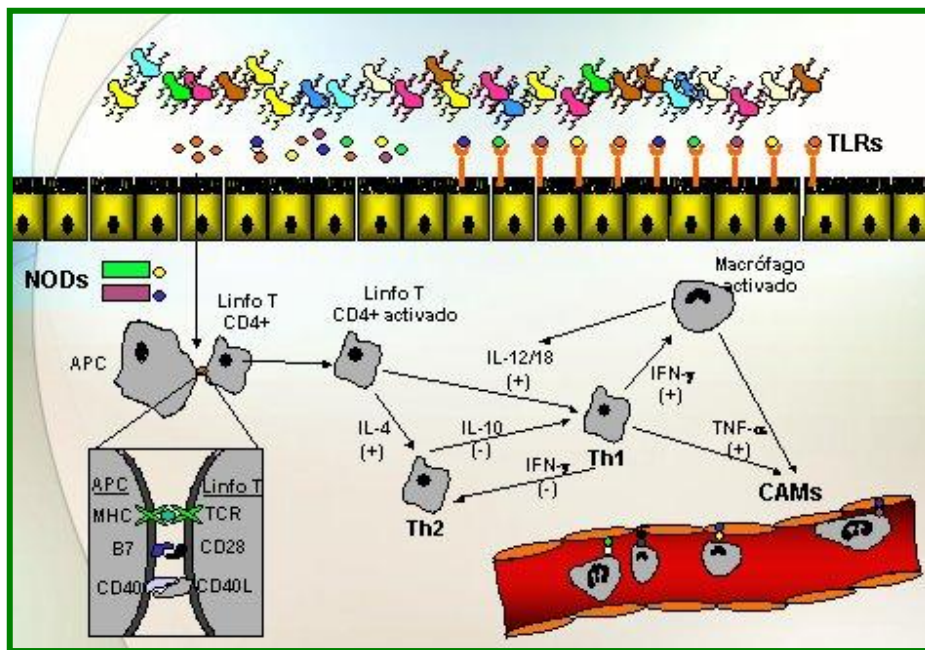
La importancia de las citoquinas y quimioquinas en la respuesta inflamatoria intestinal ha quedado sólidamente establecida por el éxito de numerosas terapias inmunoregulatoras utilizadas en modelos de colitis experimental (Neurath *et al.* 1996; Ten Hove *et al.* 2001). En humanos, hasta el momento se han utilizado anticuerpos frente al TNF que han dado buenos resultados tanto en la CU como en la EC (Sands *et al.* 2004). Entre las sustancias implicadas destacan el leucotrieno B4 (LTB4) y la IL-8, liberadas, entre otros mediadores, por las células del epitelio (Kagnoff y Eckmann, 1997). El LTB4 tiene un claro efecto proinflamatorio derivado de su actividad quimiotáctica y activadora de neutrófilos, que puede ser responsable de gran parte de los fenómenos de citotoxicidad directos sobre el tejido intestinal, a través de la secreción de diversas proteasas y radicales libres (Yamada, 1994). Además, se produce el acúmulo de leucocitos en la mucosa intestinal y la producción de múltiples mediadores proinflamatorios, incluyendo, la prostaglandina E2 (PGE2), el ácido 5-hidroxicosatotetraenoico (5-HETE), el 12-HETE, el 15-HETE y el factor activador de plaquetas (PAF) (Wallace *et al.* 1994).

La regulación del sistema inmunológico intestinal se ha investigado profundamente en modelos animales. Así, se han generado varios modelos de colitis, tanto Th1 como Th2, utilizando la inactivación funcional de citoquinas reguladoras. Estos modelos destacan la importancia de que exista una regulación controlada de la respuesta inmune de la mucosa (Rennick *et al.* 1995).

#### **5.1.4. Modelos animales inducidos de colitis experimental**

Estos modelos están siendo utilizados desde la década de los 80 en el estudio de la fisiopatología de la EII. Entre las diferentes sustancias inductoras podemos distinguir agentes químicos, polisacáridos sulfatados e inmunocomplejos microbianos, así como otros fármacos. Los estudios llevados a cabo mediante estos modelos experimentales han

focalizado su atención en mecanismos de inmunidad innata (células presentadoras de antígeno, neutrófilos, moléculas del complemento y citotoxicidad), inflamación no específica (eicosanoides, mieloperoxidasa, citocinas y radicales libres de oxígeno) y reparación (fibrosis y factores de crecimiento). En general son modelos influenciados por la flora bacteriana intestinal y por diversos componentes dietéticos. Suelen ser altamente reproducibles y las especies animales empleadas, principalmente rata y ratón, fácilmente manipulables.



**Figura 34.** Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal.

La colitis experimental puede inducirse mediante la administración de enemas intracolónicos de ácido acético, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS)/Etanol y oxazolona. Otras vías de administración son la oral para los polímeros y polisacáridos sulfatados y la subcutánea para la ciclosporina e indometacina. Las colitis inducidas de forma oral cursan con una fase aguda que puede durar entre una y varias semanas, mientras que en las colitis inducidas por enemas, la fase aguda se limita a unos 3 días postinducción. En este instante se observa un aumento de ciertos marcadores inflamatorios que se correlacionan con la gravedad del proceso inflamatorio intestinal. Estos mediadores inflamatorios provienen del metabolismo del ácido araquidónico (eicosanoides, COX), del metabolismo oxidativo (metabolitos reactivos de oxígeno, iNOS, mieloperoxidasa, etc.) y de reacciones inmunológicas a nivel intestinal (citoquinas, factores de crecimiento). En general, el proceso inflamatorio intestinal evoluciona sin aparición de nuevos brotes llegando a resolverse de forma espontánea (Almero, 2007).

Entre los modelos de colitis experimental más empleados en la actualidad destacan la colitis inducida por TNBS y la inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS). A diferencia de la colitis inducida por enemas diluidos de ácido acético, en la colitis inducida por TNBS o DSS se puede distinguir una fase aguda inicial que puede evolucionar hacia un proceso inflamatorio de características crónicas con presencia de estenosis, adherencias, engrosamiento de la pared intestinal, diarrea sanguinolenta y una significativa pérdida de peso de los animales.

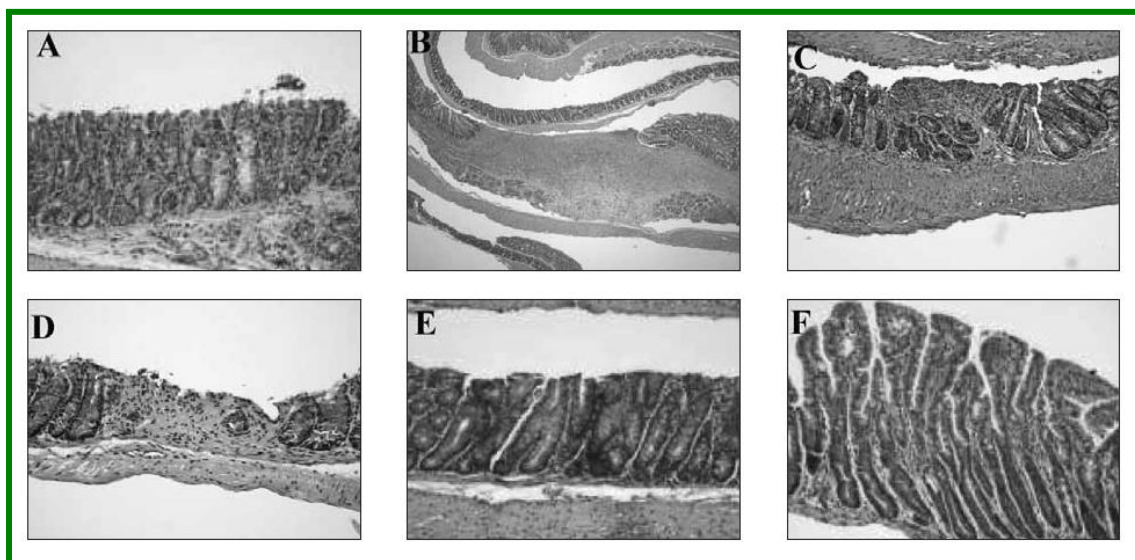
### **Colitis inducida por TNBS**

La colitis inducida por instilación intrarrectal de un enema de TNBS diluido en etanol fue descrito por primera vez en ratas por Morris *et al.* (1989). Este modelo se ha reproducido en otras especies animales como en ratones y conejos (Elson *et al.* 1995).

Un solo enema de TNBS llega a provocar una colitis de hasta 8 semanas de duración en las líneas de ratas más susceptibles. El enema de TNBS/etanol provoca lesión continua, restringida al colon distal, con importantes áreas de necrosis y de afectación transmural (**Figura 35**). Se ha sugerido un mecanismo patogénico basado en la capacidad del etanol para debilitar la barrera mucosa, lo que facilitaría el contacto entre antígenos lumbinales colónicos y de la *lamina propria* (Morris *et al.* 1989). Comienza la fase inicial con la participación de macrófagos y neutrófilos activados por una gran variedad de estímulos que generan grandes cantidades de metabolitos altamente reactivos de oxígeno. Los efectos deletéreos pueden verse agudizados por la causticidad propia del TNBS que puede generar sustancias poderosamente citotóxicas como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . Adicionalmente, el TNBS puede modificar la estructura de proteínas de la superficie celular por su capacidad de unirse covalentemente a residuos de lisina y tirosina. Esto provoca una inmunoreactivación por parte de macrófagos y linfocitos T semejante a una reacción de hipersensibilidad retardada por alérgenos (Cogswell y Scott, 1988; Grisham *et al.* 1992).

Numerosos estudios han evaluado diversas terapias farmacológicas con este modelo experimental (Bentran *et al.* 1996; Triantafillidis *et al.* 2005). Estudios nutricionales han mostrado la capacidad de los AGPI de la serie *n*-3 de atenuar el proceso inflamatorio (Andoh *et al.* 2003; Isozaki *et al.* 2006), tal vez mediado a través de la modulación de la síntesis de LTB<sub>4</sub> (Gassull *et al.* 2005). Antioxidantes, bacterias probióticas y prebióticos, también se han mostrado eficaces para reducir la lesión inducida por TNBS/etanol (Cherbut *et al.* 2003; Isozaki *et al.* 2006; Loren *et al.* 2006).





**Figura 35.** Lesiones colónicas observadas en ratones inducidos con 1 mg de TNBS/Etanol (50% v/v). A y C) Áreas de necrosis, criptitis, engrosamiento de la capa muscular e intenso infiltrado agudo. B-D) Úlceras delimitadas, de afectación transmural e intenso infiltrado mononuclear. E,F) Fenómenos de hiperplasia.

## 5.2. Ácidos grasos de la dieta, tocoferoles y enfermedad inflamatoria intestinal

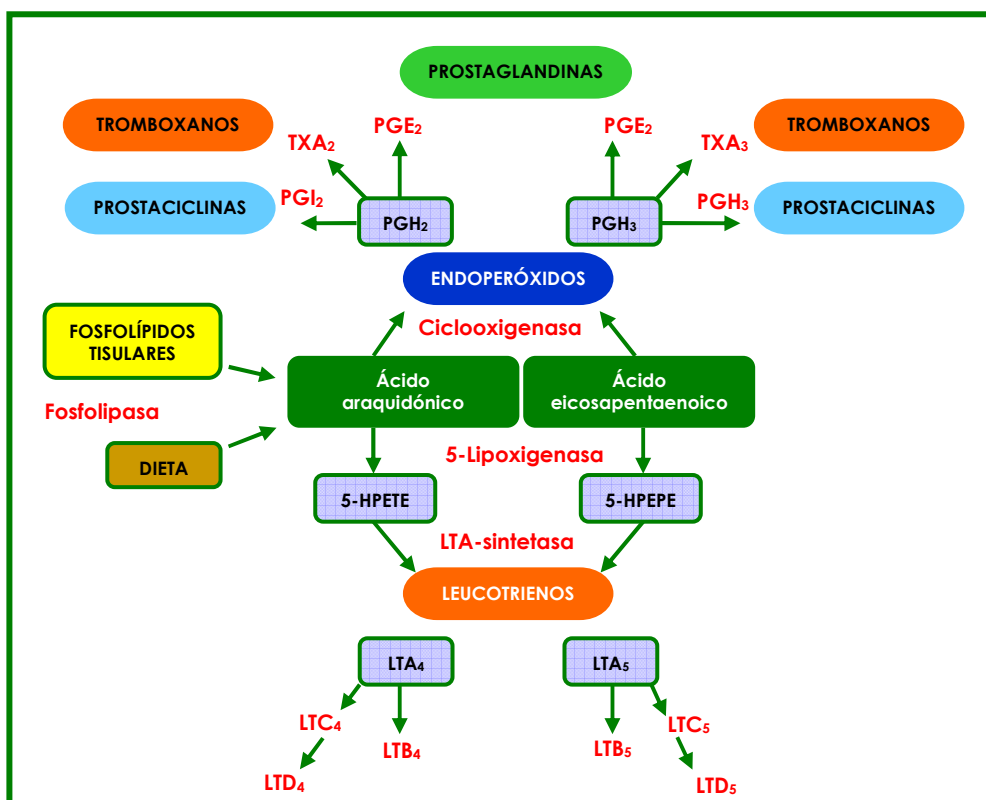
### 5.2.1. Ácidos grasos

Existen multitud de estudios que abordan el papel de los ácidos grasos de la dieta en la inflamación. No obstante, los resultados obtenidos de estos estudios son en muchos casos contradictorios como consecuencia, probablemente, de las diferencias en los diseños experimentales y en las fuentes de ácidos grasos utilizadas. A continuación se discutirán las teorías más aceptadas y los estudios más significativos a este respecto.

Distintos estudios científicos indican que los AGPI de la serie *n*-3, así como el ácido oleico, pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades crónicas como la EII, la psoriasis, la artritis reumatoide, el asma o la neumonía. De hecho, se ha propuesto que la manipulación del perfil lipídico de la dieta puede ser un instrumento útil en el tratamiento de procesos inflamatorios, que podría disminuir la necesidad del uso de fármacos antiinflamatorios que provocan frecuentes efectos adversos (De la Puerta *et al.* 2004). Concretamente, y en relación con la EII, varios estudios en animales de experimentación han demostrado que la administración de dietas basadas en aceite de oliva o girasol y enriquecidas en ácido docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) o  $\alpha$ -linolénico, pueden ser beneficiosas en el tratamiento de la colitis (Shoda 1995; Camuesco *et al.* 2005; Whiting *et al.* 2005). Diversos autores han indicado que la

suplementación de la dieta en humanos con AGPI de la serie *n*-3 (1-8 g) es beneficiosa en el tratamiento de la EII (Nieto *et al.* 1998; Gil, 2002). Por otro lado, se ha descrito que la suplementación con AGPI *n*-3 junto con antioxidantes en pacientes con EII induce un mayor efecto inmunomodulador, ya que éstos mejoran la estabilidad de los ácidos grasos y previenen los posibles inconvenientes de carácter oxidativo que puedan ejercer (Geerling *et al.* 2000).

La teoría más aceptada hasta la fecha indica que el ácido linoleico y el  $\alpha$ -linolénico son metabolizados en el ser humano hasta ácido araquidónico y EPA, respectivamente, en el intestino delgado, hígado y cerebro. Dada la abundancia relativa de ácido linoleico en la dieta, el ácido araquidónico es el compuesto mayoritario que se incorpora a los fosfolípidos de las membranas celulares. Tanto el ácido araquidónico como el EPA son precursores de distintos mediadores proinflamatorios (tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos). No obstante, mientras que los derivados del ácido araquidónico tienen una elevada actividad proinflamatoria (prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4), los derivados del EPA son débilmente inflamatorios (prostaglandinas de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5) (**Figura 36**).



**Figura 36.** Metabolismo oxidativo del ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico mediante las vías de la ciclooxigenasa y 5-lipoxigenasa. 5-HPETE: ácido 5-hidroxiicosatetraenoico, 5-HPEPE: ácido 5-hidroxiicosapentaenoico.

Diversos estudios han observado que el EPA puede inhibir el metabolismo del ácido araquidónico. Como consecuencia, estos estudios concluyen que el EPA y los ácidos grasos de la serie *n*-3 en general podrían ser antiinflamatorios, ya que evitarían la producción de los eicosanoides más proinflamatorios que son los derivados de la serie *n*-6 (Martínez-Augustín, 2007). No obstante un estudio en ratas utilizando el modelo del TNBS indica que los AGPI de la serie *n*-3 pueden incrementar el daño oxidativo al disminuir la defensa antioxidante (Nieto *et al.* 1998).

Por otra parte, se ha observado que la ingesta de ácido oleico (serie *n*-9) podría ser también beneficiosa ya que podría inhibir la formación de leucotrieno B4. El mecanismo implicado está relacionado con la inhibición de la enzima leucotrieno A4 hidrolasa por parte del ácido docosatrienoico que es un derivado del ácido oleico. Esta enzima cataliza la conversión de leucotrieno A4 en leucotrieno B4. Por otra parte, en un estudio reciente se ha descrito que en distintos modelos de inflamación intestinal se produce una disminución en la actividad de la  $\Delta$ -9-desaturasa, enzima encargada de la síntesis endógena de ácido oleico. Los autores de este estudio han observado que esta disminución de la actividad está relacionada con la inflamación, y que la administración de ácido oleico la atenúa. Aunque los mecanismos implicados en este efecto no están claros, los autores indican que el ácido oleico podría regular la actividad del receptor activado por proliferadores de peroxisomas- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), un factor de transcripción muy importante en la transducción de señales antiinflamatorias (Chen *et al.* 2008). Por último, experimentos *in vitro* con células de músculo liso de pacientes con enfermedad de Crohn indican que el ácido linoleico, pero no el oleico, es capaz de incrementar la producción de IL-8 (Alzoghaibi *et al.* 2003).

A pesar de lo anteriormente expuesto, hace unos años se lleva a cabo un estudio en pacientes con enfermedad de Crohn en el que se estudia el efecto de la composición lipídica de la grasa de la dieta. En este estudio se utiliza una dieta rica en AGMI (oleico), y otra rica en AGPI de la serie *n*-6. Los autores observan que la dieta rica en AGPI de la serie *n*-6 es más efectiva en la inducción de remisión que la dieta rica en ácido oleico (Gassull *et al.* 2002). El efecto del ácido araquidónico en la EII no se había estudiado hasta hace muy poco ya que, como hemos indicado anteriormente, desde un principio se había asumido que al estimular la síntesis de moléculas proinflamatorias, su administración tendría efectos proinflamatorios. Además, diversos estudios han descrito que la mucosa intestinal de pacientes con EII posee niveles de ácido araquidónico proporcionalmente elevados (Pacheco *et al.* 1987). No obstante, muy recientemente han aparecido dos estudios muy interesantes en modelos animales de inflamación intestinal que indican que la administración de ácido araquidónico en la dieta no sólo no produce un efecto proinflamatorio, sino que además podría tener un efecto antiinflamatorio (Roy *et al.* 2007; Ramakers *et al.* 2008).

En uno de estos estudios se utiliza el modelo de colitis inducida por la administración de sulfato sódico de dextrano en el agua de bebida de ratones (Ramakers *et al.* 2008). Estos ratones son alimentados con dietas que contienen un 14% (m/m) de grasa. En la dieta control un 6% de este 14% de grasa es ácido oleico. Además, se administran dos dietas distintas en las que un 1% del ácido oleico se sustituye por EPA+DHA o ácido araquidónico. Los animales son estudiados a los 7 días de la inducción de la colitis y se observa que los del grupo alimentado con la dieta rica en AA ganan peso mientras que los de los otros dos grupos pierden peso. Además, en el grupo que recibe la dieta rica en ácido araquidónico se observa una menor incidencia de diarrea. Paralelamente, la administración de las distintas dietas no produce diferencias significativas en los índices de daño macroscópico, en los índices histológicos o en los niveles de citoquinas colónicas (IL-12p70, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , MCP-1, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2), mientras que sí se observa una disminución de la actividad mieloperoxidasa en los animales alimentados con la dieta que contiene EPA+DHA. Es interesante resaltar que la administración de la dieta que contiene ácido araquidónico produce un incremento significativo de los niveles de éste en los fosfolípidos extraídos del colon de estos animales. Concluyen los autores que son necesarios más estudios para dilucidar el papel de los ácidos grasos de la dieta en la colitis.

Los ratones *knock out* de IL-10 desarrollan inflamación intestinal en presencia de flora microbiana. En un estudio en el que se alimenta a estos ratones con dietas suplementadas con EPA o ácido araquidónico (al 3.7% + 1% aceite de maíz) se describe que son antiinflamatorias en comparación con dietas que contienen ácido oleico (3.7% + 1% aceite de maíz) o aceite de maíz sin suplementar (al 5%) (Roy *et al.* 2007). La dieta enriquecida en ácido araquidónico disminuye los niveles de PG endoperoxido sintetasa 2, que es un mediador muy importante en la inflamación. Además, esa dieta disminuye la producción de IL-6 y TNF $\alpha$ . Estos resultados son cuando menos interesantes puesto que se había propuesto hasta ahora que, ya que el ácido araquidónico es el principal inductor *in vitro* de la PTGS2, enzima que cataliza la formación de prostaglandina E2 que es proinflamatoria, la dieta mencionada debería tener efecto proinflamatorio *in vivo*. No obstante, también se ha observado que la prostaglandina E2 inhibe la producción de TNF $\alpha$  e IL6 por monocitos y macrófagos y que inhibe la 5-lipooxigenasa, interfiriendo por tanto en la producción de leucotrieno B4, por lo que el ácido araquidónico podría dar lugar a la producción de lipoxinas antiinflamatorias.

### 5.2.2. Tocoferoles

Diferentes estudios han revelado el importante papel de la vitamina E en el tratamiento de la EII. Isozaki *et al.* (2006), inducen la EII en ratas mediante enemas rectales de TNBS, 24 horas después inyectan vitamina E intraperitoneal y esta dosis se repite diariamente. Una semana después de la inducción de la colitis se mide el

porcentaje de daño, peso húmedo, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (como índice de peroxidación lipídica) y la actividad de la mieloperoxidasa en tejidos asociados a la mucosa del colon. En el grupo tratado con la vitamina E se observa que se reduce la inhibición del incremento de peso, disminuye el porcentaje de daño y el peso húmedo, descenso de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y disminución de la actividad de la mieloperoxidasa. Los resultados sugieren que la vitamina E es efectiva para el tratamiento en ratas de la colitis inducida por TNBS.

En otro estudio similar llevado a cabo por González *et al.* (2001), tras la administración de vitamina E, se observa un incremento de los niveles colónicos de vitamina E, reducción del peso del colon y del porcentaje de daño, prevención de la peroxidación lipídica, disminución de la diarrea, reducción de los niveles de IL-1 $\beta$ , se preserva la actividad de la glutatión reductasa y los niveles totales de glutatión y no se modifican los niveles de mieloperoxidasa, que son indicativos de infiltración neutrófila en el colon inflamado. Llegan a la conclusión de que en ratas, la vitamina E protege el colon del estrés oxidativo asociado con la inflamación.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. TOMA Y ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

Todas las muestras de aceite de argán analizadas corresponden a aceite de argán virgen y proceden de Marruecos, concretamente de la zona suroeste que se extiende al pie de las montañas del Alto Atlas oriental y del Anti Atlas (**Figura 37**). Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, en esta zona se concentra el mayor bosque de árboles de argán a nivel mundial. Aunque recientemente, se intenta instaurar su cultivo en otras latitudes como el desierto de Negev en Israel o el norte de Marruecos, ha sido imposible conseguir muestras de aceite de estas regiones.

En la **Tabla 6** se detalla el lugar y fecha de adquisición de las muestras y si su venta se realiza como aceite envasado o “a granel”. Sólo de algunas de ellas conocemos el lugar exacto de producción, ya que o bien carecen de etiquetado o la información aportada en la etiqueta es muy escasa.

En el presente estudio se ha considerado oportuno diferenciar las muestras en dos grupos, en función del método de extracción del aceite: método tradicional y método semi-industrial, anteriormente descritos. La información al respecto ha sido obtenida de la etiqueta o a través de las personas que nos las facilitaron, y a las que reiteramos nuestro agradecimiento, dada la dificultad para recabar un número de muestras estadísticamente significativo. Resultó imposible adquirir muestras directamente en España.

En cuanto al volumen de muestra inicial, osciló entre 0,25 – 1 L, predominando el envasado en material de vidrio o plástico, pero en ningún caso se utilizaba un envase opaco para proteger el aceite de la luz. Algunas de las muestras de aceite obtenidas por el método semi-industrial se encontraban precintadas e incluso lacradas.

Una vez en el laboratorio, las muestras han sido conservadas protegidas de la luz, en botes de cristal topacio, y se han mantenido en refrigeración a +4°C hasta la realización de las distintas determinaciones.

Por último, a título más bien de curiosidad, y aprovechando la formación en análisis sensorial de algunos de los miembros del grupo de investigación, se evaluaron sus características organolépticas en el momento de su recepción. Se ha considerado oportuno, incluir en la **Tabla 6** algunos de los descriptores sensoriales más citados en cuanto a color y flavor.





**Figura 37.** Mapa político de Marruecos. En color rojo están marcados los lugares de adquisición de las muestras de aceite de argán y en verde las zonas de producción de algunas de estas muestras.

**Tabla 6.**

Cuadro resumen con la descripción de las muestras analizadas.

Muestra	Lugar de adquisición	Fecha de adquisición	Método obtención	Presentación (venta)	Zona de producción	Descripción organoléptica	
						Color	Flavor
1	Rabat	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Anaranjado oscuro	Intenso "almendra tostada"
2	Rabat	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Ámbar claro	Suave "almendra tostada"
3	Fez	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Anaranjado	Suave "almendra tostada"
4	Tánger	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Amarillo oscuro	Intenso "almendra tostada"
5	Tánger	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Amarillo oscuro	Intenso "almendra tostada"
6	Rabat	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Anaranjado muy oscuro	Intenso "almendra tostada"
7	Casablanca	2005	Semi-industrial	Envase vidrio	Essaouira	Ámbar oscuro	Intenso "almendra tostada"
8	Región Essaouira	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Anaranjado intenso	Intenso "almendra tostada"
9	Región Essaouira	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Anaranjado muy oscuro	Intenso "almendra tostada"
10	Región Essaouira	2005	Tradicional	Envase plástico	-	Anaranjado	Intenso "almendra tostada"
11	Rabat	2005	Semi-industrial	Envase vidrio	Essaouira	Amarillo muy claro	Suave "avellana"
12	Tánger	2006	Tradicional	Envase plástico	Essaouira	Anaranjado	Intenso "almendra tostada"
13	Agadir	2006	Tradicional*	Envase plástico	Agadir	Amarillo muy claro	Suave "almendra sin tostar"
14	Agadir	2006	Tradicional	Envase plástico	Agadir	Anaranjado	Intenso "almendra tostada"
15	Agadir	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Agadir	Anaranjado claro	Suave "almendra tostada"
16	Casablanca	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Essaouira	Anaranjado oscuro	Intenso "almendra tostada"
17	Desconocido	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Essaouira	Anaranjado oscuro	Suave "almendra tostada"
18	Desconocido	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Essaouira	Ámbar claro	Suave "almendra tostada"
19	Casablanca	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Agadir	Anaranjado oscuro	Intenso "almendra tostada"
20	Casablanca	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Tiznit	Anaranjado oscuro	Intenso "almendra tostada"
21	Agadir	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Agadir	Anaranjado claro	Suave "avellana tostada"
22	Desconocido	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Agadir	Anaranjado	Intenso "almendra tostada"
23	Desconocido	2006	Semi-industrial	Envase vidrio	Essaouira	Anaranjado	Intenso "almendra tostada"
24	Región Essaouira	2006	Tradicional	Envase plástico	Essaouira	Dorado	Suave "almendra tostada"
25	Tiznit	2006	Tradicional*	Envase plástico	Tiznit	Dorado claro	Suave "almendra sin tostar"
26	Desconocido	2006	Tradicional	Envase plástico	-	Anaranjado	Intenso "almendra tostada"

\*Aceite obtenido a partir de semillas no sometidas a proceso previo de tostado.

## 2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD

Para la determinación de estos parámetros de calidad se han aplicado los métodos oficiales de análisis recogidos en el Reglamento (CEE) 2568/1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis y posteriores modificaciones (Reglamentos (CE) 796/2002 y 1989/2003).

La **validación de los métodos analíticos empleados** en la determinación del grado de acidez, índice de peróxidos, absorbancia al ultravioleta ( $K_{270}$  y  $K_{232}$ ) y determinación de ácidos grasos (apartado 4), se ha realizado empleando dos materiales de referencia para aceite de oliva: aceite de oliva lampante (100%) y mezcla de aceite de oliva virgen extra (aproximadamente 60%) y aceite de girasol (aproximadamente 40%).

Este material de referencia certificado ha sido elaborado mediante un estudio de certificación denominado “Campana InterOLEO-MRC 2006” a iniciativa de la Dirección General de Industrias y Promoción Agroalimentaria dependiente de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

Al aplicar un test de contraste de hipótesis adecuado (contraste de hipótesis para la media) a las mediciones de cada parámetro ( $n=6$ ) en ambos materiales de referencia, se acepta la igualdad de la media observada con la del valor certificado para un nivel de significación estadística del 95%.

### 2.1. Grado de acidez

Indica la cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite, expresados en % de ácido oleico, palmítico o láurico. En caso de que no se especifique más que acidez, se expresará en ácido oleico. Un incremento en el valor obtenido va asociado al mal estado de los frutos, a un proceso incorrecto de elaboración o a una mala conservación del aceite.

#### **Objetivo:**

Determinar los ácidos grasos libres en las muestras de aceite de argán. El contenido en ácidos grasos libres se expresa mediante la acidez calculada según el método convencional.

**Fundamento:**

Disolución de la muestra en una mezcla de disolventes y la valoración de los ácidos grasos libres mediante una disolución etanólica de hidróxido potásico.

**Reactivos:**

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida y el agua utilizada debe ser agua destilada o de una pureza equivalente.

- Mezcla de éter dietílico y etanol de 95% (Panreac) (v/v), en proporción 1:1 (v/v). Debe neutralizarse exactamente en el momento de su utilización con la disolución de hidróxido potásico en presencia de fenolftaleína.
- Disolución etanólica valorada de hidróxido potásico (Panreac) 0,1 M (o en caso necesario 0,5 M).
- Disolución de 10 g/L de fenolftaleína en etanol de 95-96% (Panreac) (v/v).

**Material:**

- Balanza analítica Mettler AE 200, Mettler Instrument, Zurich.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad.
- Bureta de 10 mL de capacidad, con graduación de 0,05 mL, (Protón) calibrada a 20°C.
- Pipeta aforada de 11 mL, error inferior a 0,02 mL.

**Procedimiento:**

**Preparación de la muestra para la prueba:** la determinación se efectuará en una muestra filtrada. Si el contenido global de humedad e impurezas volátiles es inferior al 1%, se utilizará la muestra tal cual.

**Cantidad de muestra:** según el grado de acidez previsto, de acuerdo con el cuadro siguiente:

Grado de acidez previsto	Peso de la muestra (g)	Precisión de la pesada de la muestra (g)
< 1	20	0,05
1 a 4	10	0,02
5 a 15	2,5	0,01
16 a 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

### Determinación:

Se disuelve la muestra en 50 a 150 mL de la mezcla de éter dietílico y etanol, previamente neutralizada. Se valora, agitando, con la disolución de hidróxido potásico 0,1 M hasta el viraje del indicador (la coloración rosa debe permanecer al menos durante 10 segundos).

### Expresión de los resultados:

Expresión del grado de acidez en porcentaje de ácido oleico:

$$Acidez(\%) = V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{P} = \frac{V \times c \times M}{10 \times P}$$

siendo:

$V$  = volumen en mL de la disolución valorada de hidróxido potásico utilizada.

$c$  = concentración exacta, en moles por litro, de la disolución de hidróxido potásico utilizada.

$M$  = masa molecular del ácido en que se expresa el resultado (en nuestro caso, ácido oleico,  $M=282$ ).

$P$  = gramos de muestra utilizada.

Se tomará como resultado la media aritmética de tres determinaciones.

## 2.2. Índice de peróxidos

El índice de peróxidos mide el grado de oxidación primaria de un aceite, e indica el estado de conservación del mismo. Se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por Kg de aceite (en las condiciones en las que se opera).

Los peróxidos se consideran como los primeros productos de la oxidación de los aceites y su formación sigue, al menos durante las primeras etapas, una marcha paralela a la cantidad de oxígeno absorbido.

Existen una serie de factores que influyen sobre la velocidad de oxidación; unos retardándola, como son ciertas sustancias denominadas "antioxidantes", y otras acelerándola. Dentro de estos últimos, los principales son: luz, calor (elevada temperatura o cambios bruscos de temperatura), trazas metálicas, catalizadores orgánicos, humedad, restos de materia orgánica, etc.

**Objetivo:**

Determinar el índice de peróxidos en las muestras de aceite de argán.

**Fundamento:**

Medida mediante volumetría de una muestra disuelta en ácido acético y cloroformo y tratada con disolución de yoduro potásico (en presencia de almidón como indicador). El yodo liberado se valora con disolución de tiosulfato sódico de normalidad conocida.

**Reactivos:**

- Cloroformo para análisis (Panreac).
- Ácido acético glacial para análisis (Panreac).
- Disolución acuosa saturada de yoduro potásico (PRS), recién preparada, exenta de yodo y yodatos.
- Disolución acuosa de tiosulfato sódico (Panreac) 0,01 N ó 0,02 N valorada exactamente.
- Disolución acuosa de almidón de 10 g/L, recién preparada con almidón soluble (Panreac).

**Material:**

Todo el material utilizado debe estar exento de sustancias reductoras u oxidantes.

- Pipetas de 10 y 25 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Matraces con cuello y tapón esmerilados de 250 mL de capacidad, previamente secados.
- Bureta de 25 ó 50 mL, graduada en 0,1 mL (Protón), con error inferior a 0,02 mL, calibrada a 20°C.

**Procedimiento:**

El ensayo se realizará con luz natural difusa o con luz artificial. Se pesa con precisión de 0,001 g en un matraz, la cantidad de muestra en función del índice de peróxidos que se presuponga, con arreglo al cuadro siguiente:

Índice de peróxidos que se supone (meq de O <sub>2</sub> / Kg)	Cantidad de la muestra problema (g)
De 0 a 12	De 5,0 a 2,0
De 13 a 20	De 2,0 a 1,2
De 21 a 30	De 1,2 a 0,8
De 31 a 50	De 0,8 a 0,5
De 51 a 90	De 0,5 a 0,3

#### **Determinación:**

Se añaden 10 mL de cloroformo. Se disuelve rápidamente la muestra mediante agitación. Se añaden 15 mL de ácido acético y, a continuación, 1 mL de yoduro potásico. Se cierra rápidamente el matraz, se agita durante 1 minuto y se mantiene en la oscuridad durante 5 minutos exactamente, a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C.

Se añaden 75 mL aproximadamente de agua bidestilada desionizada. Se valora (agitando al mismo tiempo vigorosamente) el yodo liberado con la disolución de tiosulfato sódico (disolución 0,002 N si se presuponen valores inferiores a 12 y disolución 0,01 N si se presuponen valores superiores a 12), utilizando la disolución de almidón como indicador. Se efectúan tres determinaciones por muestra.

Se realiza simultáneamente un ensayo en blanco. Si el resultado del ensayo en blanco sobrepasa 0,05 mL de la disolución de tiosulfato sódico 0,01 N, es necesario sustituir los reactivos.

#### **Expresión de los resultados:**

El índice de peróxidos (IP), expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por Kg de aceite se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$IP = \frac{V \times N \times 100}{P}$$

siendo:

$V$  = mL de disolución valorada de tiosulfato sódico empleados en el ensayo, previamente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco.

$N$  = normalidad exacta de la disolución de tiosulfato sódico empleado.

$P$  = peso en gramos de la muestra problema.

El resultado será la media aritmética de tres determinaciones.

### **2.3. Absorbancia al ultravioleta ( $K_{270}$ y $K_{232}$ )**

Los ácidos grasos insaturados son sensibles a las oxidaciones autocatalíticas, induciendo la extensión de este proceso a otros ácidos grasos. En primer lugar aparecen hidroperóxidos, poco estables, que absorben cerca de una longitud de onda de 232 nm. A continuación, son las dicetonas y las cetonas  $\alpha$ -insaturadas las que absorben cerca de los 270 nm. También pueden formarse hidroxilos y carbonilos, que incrementan la absorbancia de la radiación ultravioleta entre 260 y 280 nm, con un máximo alrededor de

270 nm. El coeficiente de extinción específica aumenta conforme la alteración oxidativa es mayor, hasta fases muy avanzadas. Por esto, complementa la información obtenida con el índice de peróxidos.

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

El estudio de la zona de absorción ultravioleta que va desde 220-300 nm es indispensable para conocer no sólo el estado de oxidación de un aceite, sino también modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos o bien, una posible adulteración. Normalmente se determinan los parámetros o coeficientes  $K_{270}$  y  $K_{232}$ ; un estado medio de oxidación presenta un máximo de absorción a 232 nm mientras que los aceites refinados y muy oxidados así como la presencia de dienos y trienos conjugados, presentan un máximo a 270 nm.

Las absorciones en las longitudes de onda indicadas se deben a la presencia de sistemas diénicos y triénicos conjugados. Los valores de estas absorciones se expresan en extinción específica  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  (extinción de una disolución de la materia grasa en el disolvente determinado en una cubeta con espesor de 1 cm) que se expresará convencionalmente como K, también denominado coeficiente de extinción.

**Objetivo:**

Determinar el coeficiente de extinción al ultravioleta ( $K_{270}$  y  $K_{232}$ ) en muestras de aceite de argán.

**Fundamento:**

El aceite se disuelve en el disolvente requerido y se determina la extinción de la disolución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro. A partir de los valores espectrofotométricos se calculan las extinciones específicas.

**Reactivos:**

- Ciclohexano para espectrofotometría en el ultravioleta, el cual presentará los siguientes valores mínimos de transmisión: a 220 nm, 40%; a 250 nm, 95%.

**Material:**

- Cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor.
- Matraces aforados de 10 mL, con tapón de vidrio.



**Instrumental:**

- Espectrofotómetro Model S-22 UV-Vis (Boeco).

**Procedimiento:**

La muestra debe ser homogénea y estar exenta de impurezas en suspensión.

Se pesa con exactitud, en un matraz aforado de 10 mL, 40 mg de aceite. Se disuelve con ciclohexano y se completa hasta el enrase. Empleando ciclohexano como referencia, se mide la extinción a 270 nm y a 232 nm. La lectura a 270 nm debe estar comprendida entre 0,1 y 0,8. En caso contrario, se repetirá la medida bien diluyendo convenientemente o procediendo a una nueva pesada. Se realizan al menos tres lecturas y se calcula la media.

**Expresión de los resultados:**

Se expresan las extinciones específicas o coeficientes de extinción a las diversas longitudes de onda, calculadas como sigue:

$$K_{\lambda} = \frac{L}{C \times E}$$

siendo:

$\lambda$  = 270 ó 232 nm.

$L$  = lecturas a 270 nm ó 232 nm.

$E$  = espesor de la cubeta en cm (1 cm).

$C$  = concentración de la muestra en g por 100 mL.

**Comprobación del espectrofotómetro:**

Disolver 0,200 g de cromato potásico en 1000 mL de hidróxido potásico 0,05 N. Tomar 25 mL de esta disolución y pasarlos a un matraz aforado de 500 mL, completando hasta el enrase con hidróxido potásico 0,05 N. Leer a 275 nm frente a la disolución de hidróxido potásico 0,05 N. La lectura deberá ser  $0,200 \pm 0,005$ .

## 2.4. Humedad e impurezas volátiles

El agua, aunque es inmisible con el aceite, puede existir en forma de emulsión estabilizada por ciertos componentes. La humedad favorece la hidrólisis, sobre todo en aquellos aceites cuya acidez inicial es elevada.

**Objetivo:**

Determinar el porcentaje de humedad en las muestras de aceite de argán.

**Fundamento:**

La determinación se realiza sometiendo la muestra de aceite a calefacción en estufa a 105°C hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no exceda del 0,05 %.

**Material:**

- Balanza analítica Mettler AE 200, Mettler Instrument, Zurich.
- Estufa de desecación con regulación de temperatura, que debe alcanzar hasta 150°C como mínimo. La regulación se efectuará entre unos límites de oscilación de  $\pm 2^\circ\text{C}$ , siendo además, la temperatura uniforme en todo el espacio interior; serán tolerables diferencias que no excedan de 1°C entre posiciones extremas.
- Cápsulas de fondo plano, con dimensiones aproximadas de 80 mm de diámetro y 20 mm de altura de acero inoxidable o aluminio.
- Desecador, conteniendo como agente desecante gel de sílice con indicador QP.

**Procedimiento:**

En una cápsula, desecada previamente en estufa a 105°C y enfriada en desecador, se pesan con exactitud unos 10 g de muestra perfectamente homogeneizada. Se introduce en estufa a 105°C y se mantiene durante toda la noche. A la mañana siguiente, se deja enfriar en desecador y se pesa. Se vuelve a colocar en estufa y se repite la operación hasta que la pesada sea constante. De la diferencia de peso se obtiene el % de humedad y materias volátiles.

**Expresión de los resultados:**

$$\text{Humedad e impurezas volátiles (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_m} \times 100$$

siendo:

$P_i$  = peso (g) de la cápsula con la muestra de aceite.

$P_f$  = peso (g) de la cápsula con el aceite una vez terminada la desecación.

$P_m$  = peso (g) de la muestra.

**2.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo**

Se entiende por impurezas de un aceite el conjunto de sustancias consideradas contaminantes del producto que son insolubles en un disolvente orgánico volátil, como

es el éter de petróleo y que no hayan sido ya determinadas como humedad y materias volátiles.

En las condiciones descritas el éter de petróleo deja insolubles: impurezas mecánicas (tierra, arena y residuos diversos); parte de los ácidos oxidados libres y sus productos de polimerización; lactonas, hidratos de carbono, materias nitrogenadas, determinadas resinas, materias minerales, y no disuelve más que parcialmente los jabones alcalinos.

**Objetivo:**

Determinar el porcentaje de impurezas insolubles en éter de petróleo en las muestras de aceite de argán.

**Fundamento:**

Desecación de la muestra y posterior disolución en un disolvente orgánico volátil (éter de petróleo), filtración y pesada del filtro conteniendo las impurezas tras la desecación.

**Reactivos:**

- Éter de petróleo 40-60°C PA ISO (Panreac).
- Filtro de papel libre de residuos e impurezas.

**Material:**

- Balanza analítica Mettler AE 200, Mettler Instrument, Zurich.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad.
- Estufa de desecación con regulación de temperatura, que debe alcanzar hasta 150°C como mínimo. La regulación se efectuará entre unos límites de oscilación de  $\pm 2^\circ\text{C}$ , siendo además, la temperatura uniforme en todo el espacio interior; serán tolerables diferencias que no excedan de  $1^\circ\text{C}$  entre posiciones extremas.
- Cápsulas de fondo plano de acero inoxidable o aluminio, con dimensiones aproximadas de 80 mm de diámetro y 20 mm de altura.
- Desecador, conteniendo como agente desecante gel de sílice con indicador QP.
- Varilla de vidrio.

**Procedimiento:**

En una cápsula, previamente desecada, se pesan con exactitud unos 10 g de aceite y se introduce en estufa a  $105^\circ\text{C}$  hasta eliminación total del agua. Una vez que la muestra está desecada, se va agregando a la cápsula pequeñas cantidades de éter de petróleo para que disuelvan la grasa, agitando con una varilla de vidrio. La cantidad necesaria de

disolvente es de unos 200 mL. A continuación se va filtrando a través de un filtro de papel previamente desecado y tarado, lavando el filtro con pequeñas porciones de disolvente y recogiendo el filtrado en un matraz. Una vez el filtro está libre de grasa se introduce en estufa a 150°C donde se deseca. El incremento de peso del filtro aporta el contenido en impurezas, que se expresará referido a porcentaje de muestra.

**Expresión de los resultados:**

$$\text{Impurezas(\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_m} \times 100$$

siendo:

$P_i$  = peso (g) del filtro seco más impurezas.

$P_f$  = peso (g) filtro seco.

$P_m$  = peso (g) de la muestra.

### 3. DETERMINACIÓN DE MINERALES Y ELEMENTOS TRAZA: Cu, Fe, Cr, Mn y Pb

Debido a las bajas concentraciones en las que aparecen cobre, hierro, cromo, manganeso y plomo en los aceites vegetales comestibles, para su determinación hay que recurrir a la absorción atómica, utilizando la técnica de cámara de grafito o atomización electrotrémica (ETA-AAS). Según la bibliografía consultada, es la técnica más empleada para la determinación de minerales y elementos traza en alimentos y bebidas. Presenta numerosas ventajas, entre las que cabe destacar los bajos límites de detección que aporta para la mayor parte de los elementos, su elevada sensibilidad, fácil calibración, capacidad de análisis multielemental en la misma solución analítica, ausencia de errores sistemáticos, buena exactitud y precisión, mínima manipulación de la muestra y buena relación eficiencia-precio.

Entre las interferencias que aparecen en la ETA-AAS, son las de tipo químico las más frecuentes. Así, puede producirse volatilización del elemento en forma de moléculas (por pérdida de óxidos metálicos, presencia de haluros, etc.), formación de carburos estables y reacción del elemento con el gas inerte. Para suprimirlas se recurre al empleo de modificadores de matriz, parada de flujo durante la etapa de atomización (para impedir pérdidas por paso del gas inerte), tratamiento de los tubos con compuestos que eviten la formación de carburos refractarios con el elemento y optimización del programa de temperatura-tiempo para el horno de grafito (Slavin, 1990).

La absorción no específica se corrige fundamentalmente con correctores de fondo (lámpara de deuterio, corrector Zeeman), siendo totalmente necesario su empleo en matrices complejas. El método de adición de patrones se usa frecuentemente para comprobar y corregir interferencias de matriz en muestras de composición compleja, aunque su aplicación incrementa el tiempo y el coste del análisis.

Slavin (1990) destaca la importancia de controlar las interferencias provocadas por la presencia de cloruros en la determinación de Cr y señala que el empleo de tubos pirolíticos, produce un incremento considerable en la sensibilidad analítica.

#### **Objetivo:**

Determinar por ETA-AAS la cantidad de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb en las muestras de aceite de argán, utilizando un método directo, sin mineralización previa de la muestra. Para ello ha sido necesario, optimizar el programa temperatura-tiempo aplicado en las etapas de secado, mineralización y atomización del analito y otros parámetros

instrumentales como tipo de tubo (grafito pirolítico/no pirolítico con/sin plataforma de L'vov), modificadores de matriz, etc.

**Reactivos:**

- Disolución estándar de cobre en aceite, 1 g/Kg; 1L=0,85 Kg (Merck).
- Disolución estándar de hierro en aceite, 1 g/Kg; 1L=0,85 Kg (Merck).
- Disolución estándar de cromo en aceite, 1g/Kg; 1L=0,85 Kg (Merck).
- Disolución estándar de manganeso en aceite, 1 g/Kg; 1L=0,85 Kg (Merck).
- Disolución estándar de plomo en aceite, 1 g/Kg; 1L=0,85 Kg (Merck).
- Metilisobutilcetona (MIBK) (Merck), ACS.
- Agua bidestilada desionizada, sistema Milli-Q de Millipore (resistividad específica de 18 M $\Omega$ ·cm).
- Ácido nítrico 65% (v/v) (Merck), PA, ISO.
- Lecitina de huevo (Merck).
- n-hexano para cromatografía (Merck), PA, ISO.
- Óxido de aluminio 90 estandarizado para análisis cromatográfico en columna por adsorción (Brockmann, Merck); (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, M=101,94 g/mol).

**Material:**

- Material de vidrio de calidad contrastada.
- Matraces aforados de 10 mL. Calibrado a 20°C (error inferior a 0,02 mL).
- Embudo Büchner Scharlau.
- Columna cromatográfica; diámetro/altura= 1/10.

**Instrumental:**

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer, modelo 1100B de doble haz, con corrector de fondo de deuterio (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT), conectado a un ordenador personal Epson con impresora Epson FX-850 (Seiko Epson Corp, Japón).
- Horno de grafito Perkin-Elmer modelo HGA 700, con tubos de grafito pirolítico; como gas interno se ha empleado argón de elevada pureza (99,999%).
- Lámpara de cátodo hueco de Cu (Perkin-Elmer).
- Lámpara de cátodo hueco de Fe (Perkin-Elmer).
- Lámpara de cátodo hueco de Cr (Perkin-Elmer).
- Lámpara de cátodo hueco de Mn (Perkin-Elmer).
- Lámpara de cátodo hueco de Pb (Perkin-Elmer).
- Sistema Milli-Q de obtención de agua bidestilada desionizada, modelo RO15 (Millipore).

- Micropipeta Microtransferpettor, type Digital de Brand de 250-1000  $\mu\text{L}$  (Brand).
- Micropipeta Sealpette de volumen fijo de 10 y 20  $\mu\text{L}$ . Universal Pipettor (Jecons Scientific Limited).
- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g, Mettler AE-200 (Mettler Instrument).
- Estufa Selecta (P. Selecta).
- Rotavapor Büchi R110 (Büchi).

#### **Limpieza del material:**

Para evitar posibles contaminaciones debidas a restos de detergentes o a las propias muestras, todo el material se lava varias veces con agua destilada y se mantiene en ácido nítrico al 30% (v/v) durante 24 horas. Se enjuaga abundantemente con agua bidestilada desionizada y se seca a temperatura ambiente, en el caso del material aforado, o en estufa a 90°C. Se almacena en lugar limpio y apartado de posibles contaminaciones (Cabrera *et al.* 1995a; 1995b; Lendínez, 2004). En las micropipetas se han utilizado puntas desechables que se someten a un tratamiento previo de limpieza similar al anteriormente descrito para el resto del material.

#### **Procedimiento:**

Pesar con la mayor exactitud posible, 1 g de aceite previamente filtrado, en un matraz aforado diluir con MIBK hasta un volumen final de 10 mL. Se obtiene una disolución homogénea y transparente donde se determina de forma directa Cu, Fe, Cr, Mn y Pb por espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica, en las condiciones de medida optimizadas para cada uno de los elementos (**Tablas 7 – 11**). Se han efectuado los estudios previos para optimizar la cantidad de muestra y de disolvente.

Puesto que se ha optimizado el procedimiento analítico para cada elemento, ha sido necesario comprobar sus características analíticas y proceder a su validación.

#### **a. Calibración**

La espectroscopia de absorción atómica es una técnica comparativa, por lo que precisa de una línea de calibrado; para ello se ha efectuado una calibración con patrones del analito en medio oleoso. Posteriormente, se ha aplicado como comprobación el método de adición de patrones.

### Línea de calibrado

La línea de calibrado se ha preparado para cada elemento a partir de la disolución estándar correspondiente, obteniendo por dilución una disolución apropiada de trabajo de 850 ng/mL para Cu, Fe, Cr y de 1000 ng/mL para Mn y Pb y a partir de ella, también por dilución, los distintos patrones en una gama de concentraciones adecuadas para los niveles de los metales en las muestras problema, siempre dentro del rango de linealidad previamente establecido. Las disoluciones patrón han sido preparadas diariamente, antes de proceder a su medida.

### Método de adición de patrones

Para detectar posibles interferencias de matriz, se ha aplicado el método de adición de patrones a las muestras de estudio. Para ello, en cada caso, de la disolución de trabajo se toman volúmenes crecientes y se añaden a fracciones iguales de una misma muestra, considerando además una alícuota sin adicionar. Finalmente, todas son llevadas al mismo volumen (10 mL) diluyendo con MIBK.

### b. Límite de detección

El concepto de límite de detección (LD) de un procedimiento analítico, basado en el tratamiento estadístico del análisis del blanco o disoluciones de referencia, ha sido propuesto tanto por la IUPAC (1978) como por el Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry (1980). Se define como la menor concentración o cantidad absoluta de analito que puede diferenciarse estadísticamente del blanco, o lo que es lo mismo, que puede ser detectada en una disolución problema con una seguridad razonable. Para su cálculo la IUPAC establece la relación:

$$LD = 3 \times S_{n-1}$$

Donde  $S_{n-1}$ , es la desviación estándar para 10 lecturas de la señal del blanco o de un patrón de muy baja concentración, expresado en términos de concentración. Así se asegura un 99% de probabilidad de que la señal sea distinta del blanco.

De igual forma, la Decisión CEE 90/515 establece en los criterios de calidad de métodos analíticos, que el límite de detección equivale numéricamente al triple de la desviación estándar de las determinaciones efectuadas sobre el blanco (siendo  $n \geq 20$ ). Long y Winefordner (1983) aplican la expresión:



$$LD = K \times \frac{S_{n-1}}{m} + t \times S_m$$

siendo  $m$ , la pendiente de la recta de calibrado;  $S_m$ , desviación estándar de la pendiente;  $t$ , la  $t$  de Student para un valor de  $p < 0,001$  y  $K=3$ , para un intervalo de confianza del 99,86%, considerando que la señal del blanco sigue una distribución normal. Se recomienda trabajar a niveles 100 veces superiores al límite de detección.

También se suele utilizar el concepto de límite de cuantificación, que corresponde a una cantidad superior, de forma que el error debido al ruido de fondo del aparato o técnica, sea mínimo; se establece como 10 veces la desviación estándar. En la fórmula propuesta por Long y Winefordner (1983), será  $K=10$ .

En la normativa CEE 90/515 antes citada, se considera que el límite de cuantificación es 6 veces la desviación estándar de las determinaciones del blanco ( $n \geq 20$ ).

En el presente estudio el límite de detección se ha calculado según la definición establecida por la IUPAC, aplicada a los valores de absorbancia obtenidos de la media de 10 blancos diferentes.

### c. Sensibilidad

Se define como la facultad del método para percibir pequeñas diferencias en la concentración de analito. En las pautas que establece la Unión Europea (UE), en materia de métodos de referencia para la investigación de residuos de metales pesados, considera la sensibilidad del método analítico como la pendiente (respuesta/concentración) de la curva de calibrado en el punto de interés (CEE 90/515). Esta definición coincide con la establecida por la IUPAC y es la más aceptada y comúnmente utilizada.

Otra forma de calcular la sensibilidad analítica es a partir de datos de repetibilidad obtenidos en la línea de calibrado:

$$S_{anal} = \frac{S_R}{b}$$

No obstante, para la espectroscopía de absorción atómica, la definición de sensibilidad analítica más aceptada, es la concentración o cantidad absoluta de analito que produce un 1% de absorción, equivalente a 0,0044 unidades de

absorbancia. Es la llamada concentración característica y delimita la zona de trabajo al obtener la línea de calibrado.

La concentración característica se deduce a partir de medidas repetitivas de la absorbancia producida por un patrón de concentración determinada. Para expresar la sensibilidad como masa característica ( $m_c$ ), es decir, la masa de analito en picogramos que genera una señal de absorbancia de 0,0044 unidades, basta aplicar la fórmula:

$$M_c = \frac{v \times c \times 0,0044}{A}$$

Siendo  $v$ , el volumen de alícuota inyectada en el horno de grafito;  $c$ , la concentración de analito y  $A$ , la medida de absorbancia.

En el presente trabajo la sensibilidad (expresada en picogramos) se ha calculado como la masa de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb que genera una señal analítica de 0,0044 unidades de absorbancia.

#### **d. Exactitud**

Mediante este parámetro se evalúa la proximidad entre el valor obtenido y el valor verdadero, lo que permite comprobar la existencia o no de interferencias de matriz, así como de pérdidas o contaminaciones durante el proceso seguido.

La exactitud de un método se puede conocer por medio de:

- Empleo de materiales de referencia: Según la ISO (Internacional Organization for Standarization), un material de referencia es un material o sustancia que tiene una o varias propiedades bien establecidas, lo que permite su uso para calibrar el aparato, validar el método y asignar valores al material o sustancia problema. Estos materiales deben ser estables, homogéneos, con contenido adecuado de analito y similares a la muestra a analizar. Según el Analytical Methods Committe (Royal Society of Chemistry, 1995) los materiales de referencia empleados para validación intralaboratorio de métodos analíticos propuestos, se clasifican en:
  - Material de referencia certificado (CRM).
  - Material de referencia "casero" (HRM o House Reference Material).
- Contrastar el resultado obtenido, con el proporcionado con otro método, establecido como oficial.

- Ensayos de recuperación: el porcentaje de recuperación se evalúa de forma indirecta, añadiendo cantidades exactamente conocidas del elemento a determinar a una muestra previamente analizada.

Para evaluar este parámetro, y puesto que no se disponía en su momento de materiales de referencia con contenido certificado en estos elementos, se han realizado ensayos de recuperación sobre las muestras problema, empleando patrones disueltos en aceite de los distintos analitos. Se efectúan 3 adiciones sobre cada muestra, en cantidades apropiadas al rango de concentraciones de cada uno de los elementos en las muestras de estudio.

El porcentaje de recuperación se ha calculado a partir de la fórmula:

$$\% \text{Recuperación} = (C_t - C_i) \times 100 / C_a$$

siendo  $C_t$  la concentración total encontrada en la muestra adicionada;  $C_i$  la concentración inicial y  $C_a$  la concentración adicionada.

Los ensayos de recuperación se han efectuado sobre 6 muestras elegidas al azar entre el total muestreado, expresando los resultados en un intervalo de confianza del 95%. Los valores medios obtenidos son satisfactorios y se ajustan a los límites establecidos por organismos competentes en la materia, en relación al contenido de cada elemento en las muestras problema. Se observa que los valores de recuperación son independientes de las cantidades adicionadas.

Por otra parte y como se ha indicado antes, el uso de un material de referencia "casero" (*HMR o House Reference Material*) es aconsejable cuando no se dispone de materiales certificados. En el presente estudio se ha utilizado como tal, un aceite desmetalizado. Para su obtención se ha aplicado el método indicado por la Commission on Oils, Fats and Derivatives (1988) y en los métodos oficiales de Analytical Oils Chemistry Society (AOCS, 1992); se parte de un aceite de girasol refinado, se disuelve en hexano a razón de 1 parte de aceite y 3 de hexano; y se eluye a través de una columna de alúmina (empleando el doble de masa de alúmina activada que de aceite a purificar) con otras 5 partes de hexano. La alúmina se activa previamente en una estufa a 150°C durante 14 horas. El disolvente del eluido se elimina por evaporación bajo presión reducida. A este aceite se adicionan cantidades conocidas del elemento, procediendo a su cuantificación.

### e. Precisión

Este concepto está íntimamente relacionado con la repetibilidad y con la reproducibilidad (precisión interlaboratorio), de modo que la mayor concordancia de repetidas determinaciones sobre una misma muestra, evitará la posibilidad de errores aleatorios.

Según los criterios establecidos por la UE (CEE 90/515), la repetibilidad se debe expresar como el coeficiente de variación (CV) que se haya definido por la norma ISO 3534-1977, como la relación entre la desviación estándar (SD) y el valor absoluto de la media aritmética en las determinaciones realizadas. El coeficiente de variación de la media no deberá exceder los valores que se citan seguidamente, en función de la cantidad de analito presente en las muestras:

10 mg/Kg – 100 mg/Kg	CV = 0,20
100 mg/Kg – 1000 mg/Kg	CV = 0,15
Superior a 1000 mg/Kg	CV = 0,10

En el presente estudio, la precisión expresada como el coeficiente de variación, aparece indicada como la repetibilidad de 10 medidas sucesivas sobre una misma muestra problema. Para comprobar este parámetro se han elegido al azar, 6 muestras de aceite de argán entre el total muestreado, efectuando 10 determinaciones sucesivas sobre las mismas. Para evaluar la reproducibilidad se han analizado 6 muestras distintas en 6 días consecutivos, calculando de igual modo, el coeficiente de variación de las determinaciones.

Las **Tablas 7 - 11** recogen las condiciones de medida y las características analíticas del método para la determinación de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb, respectivamente.





**Tabla 9.**  
Condiciones de medida y características analíticas del método utilizado para la determinación de Cr en aceite de argán por ETA-AAS.

Longitud de onda: 357,8 nm  
 Rendija: 0,7 nm  
 Intensidad de lámpara: 16 mA  
 Tipo de tubo: grafito pirolítico sin plataforma  
 Corrector de fondo: lámpara de deuterio  
 Tiempo de integración: 6 s  
 Gas interno: Argón

**Programa Temperatura – Tiempo del Horno de Grafito**

Etapa	T <sup>a</sup> , °C	t rampa, s	t permanencia, s	flujo Ar, mL/min
Secado	100	10	10	300
	150	10	10	300
Mineralización	1000	20	20	300
Atomización	2400	1	4	0
Limpieza	2700	1	2	300
	40	2	10	300

Modificador de matriz: no utilizado  
 Volumen de inyección: 20 µL  
 Modalidad de lectura: área de pico

Línea de calibrado:  $A = 0,005 + 0,021 \{Cr, ng/mL\}$   
 Coeficiente de correlación: 0,9990 ( $\alpha = 1\%$ )  
 Gama de patrones: 4,25 - 17 ng/mL  
 Radio pendientes patrones-adición: 0,980 – 1,100

Límite de detección (pg): 1,0  
 Sensibilidad (pg): 3,0  
 Recuperación ( $x \pm SD$ , %): 98,15 $\pm$ 0,20 (muestras problema)  
 98,80 $\pm$ 0,15 (material de referencia)  
 Precisión (CV, %): 3,50-4,20 (determinaciones sucesivas)  
 4,60-5,40 (determinaciones entre días)

**Tabla 10.**  
Condiciones de medida y características analíticas del método utilizado para la determinación de Mn en aceite de argán por ETA-AAS.

Longitud de onda: 279,5 nm  
 Rendija: 0,2 nm  
 Intensidad de lámpara: 35 mA  
 Tipo de tubo: grafito pirolítico con plataforma de L'vov  
 Corrector de fondo: lámpara de deuterio  
 Tiempo de integración: 6 s

**Programa Temperatura – Tiempo del Horno de Grafito**

Etapa	T <sup>a</sup> , °C	t rampa, s	t permanencia, s	mL Ar/min
Secado	110	10	10	300
	150	10	10	300
Mineralización	1000	10	10	300
Atomización	1900	1	5	0
Limpieza	2650	1	2	300
	20	1	2	300

Modificador de matriz: lecitina de huevo (Merck)  
 Volumen de inyección: 10 µL  
 Modalidad de lectura: área de pico

Línea de calibrado:  $A = 0,025 + 0,011 \{Mn, ng/mL\}$   
 Coeficiente de correlación: 0,9998 ( $\alpha = 1\%$ )  
 Gama de patrones: 5 - 50 ng/mL  
 Radio pendientes patrones-adición: 0,995 – 1,000

Límite de detección (pg): 2,0  
 Sensibilidad (pg): 3,5  
 Recuperación ( $\bar{x} \pm SD$ , %): 98,70 $\pm$ 0,65 (muestras problema)  
 98,65 $\pm$ 0,70 (material de referencia)  
 Precisión (CV, %): 3,4-3,7 (determinaciones sucesivas)  
 4,0-5,2 (determinaciones entre días)





## 4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL EN ÁCIDOS GRASOS

Para el análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases es necesario transformarlos previamente en sus derivados volátiles. Este proceso de derivatización, se lleva a cabo mediante una reacción de esterificación por la que se obtienen los ésteres metílicos de dichos ácidos grasos. Esta técnica permite la determinación cualitativa y cuantitativa del perfil de ácidos grasos de los aceites vegetales comestibles.

### Objetivo:

Determinar la composición en ácidos grasos de las muestras de aceite de argán.

### Fundamento:

El análisis cromatográfico se realiza tras la reacción del aceite con metilato sódico en medio ácido y formación de los correspondientes ésteres metílicos (empleando el denominado “método del metilato sódico”). Antes de la separación cromatográfica se realiza la extracción de los ésteres metílicos con n-hexano. Los ésteres metílicos se identifican y cuantifican de acuerdo con sus tiempos de retención. Las condiciones instrumentales aplicadas en el cromatografo son las recogidas en la **Tabla 12**.

### Reactivos:

- Disolución de metilato sódico 0,2 N.
- n-hexano.
- Disolución de ácido sulfúrico en metanol.
- Disolución acuosa saturada de NaCl.

### Material:

- Matraz de fondo plano de 50 mL, cuello largo y boca esmerilada.
- Refrigerante.
- Pipetas graduadas de 5 mL.
- Pipeta aforada de 5 mL.
- Embudo, mechero, trípode y rejilla.
- Tubos de hemólisis.

### Instrumental:

- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo Autosystem, dotado con detector de ionización de llama.

- Columna capilar Supelco® 24110-n. SP 2380. Longitud: 30 m. Diámetro interno: 0,25 mm. Espesor de película: 0,2 µm.

**Tabla 12.**

**Condiciones instrumentales para la determinación de ácidos grasos en aceite de argán por cromatografía de gases.**

**T<sup>a</sup> inyector:** 230°C

**T<sup>a</sup> detector:** 250 °C

**Flujo gas portador:** Nitrógeno 20 mL/min

**Programa del Horno**

Etapa	T <sup>a</sup> , °C	t permanencia, minutos	Rampa
T <sup>a</sup> (1): inicial	60	3	5°C/min
T <sup>a</sup> (2): segunda	170	9	10°C/min
T <sup>a</sup> (3): tercera	250	4	

**Procedimiento:**

La preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realiza pesando 0,3 gramos de aceite en un matraz de 50 mL, añadiendo 6 mL de metilato sódico y colocándolo sobre una placa con un refrigerante, calentando a ebullición hasta la obtención de una sola fase y, como mínimo, 5 minutos. Se interrumpe la calefacción, se agregan al matraz 6 mL de ácido sulfúrico en metanol, se vuelve a calentar, manteniendo en ebullición durante 5 minutos. Se deja enfriar la mezcla y a continuación se agregan 5 mL de hexano y disolución acuosa saturada de NaCl en cantidad suficiente para situar la capa de hexano en el cuello del matraz. Esta disolución que contiene los ésteres metílicos, una vez filtrada, se inyecta en el cromatógrafo de gases.

**Expresión de resultados:**

Se basa en el principio de que los porcentajes en peso de cada uno de los componentes separados en la mezcla son proporcionales a las áreas de los picos obtenidos. El orden en el que se registran los distintos ésteres metílicos de los ácidos grasos será como sigue:

- de menor a mayor masa molecular en cuanto a los ésteres metílicos de los ácidos grasos, o lo que es igual, de menor a mayor número de átomos de carbono.
- dentro de una misma masa molecular (o igual número de átomos de carbono) primero aparecen los ésteres metílicos de los ácidos grasos saturados, después los de los ácidos grasos monoinsaturados y posteriormente los poliinsaturados según el número de estas insaturaciones (de menor a mayor).

## 5. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Como medida orientativa del grado de insaturación de un aceite, puede determinarse su índice de refracción. El índice de refracción de una sustancia dada indica la relación entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la sustancia problema. Por conveniencia práctica se refiere a la relación aire-sustancia.

El índice de refracción de una sustancia varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y con la temperatura.

### **Objetivo:**

Determinar el índice de refracción en las muestras de aceite de argán.

### **Instrumental:**

- Refractómetro de Abbe-Zeiss.

### **Procedimiento:**

Generalmente se determina mediante el refractómetro de Abbe-Zeiss aparato que sirve para determinar índices de refracción comprendidos entre 1,3 y 1,7. Presenta la ventaja de requerir muy poca cantidad de muestra.

El aceite debe estar limpio. Se lleva la materia grasa al espacio comprendido entre los dos prismas y se hace la lectura después de al menos, 5 minutos de contacto.

### **Expresión de resultados:**

En el caso de que la lectura no se haya efectuado a la temperatura de 25°C que es la que se aplica normalmente en la determinación de aceites de semillas, se debe corregir, para lo cual se le suma o resta la constante 0,000365 por cada grado que la temperatura sea superior o inferior.

## 6. DETERMINACIÓN DE CERAS

### Objetivo:

Determinar el contenido en ceras en las muestras de aceite de argán.

### Fundamento:

El análisis se lleva a cabo siguiendo el Reglamento (CEE) nº 183/1993 de la Comisión, de 29 de enero de 1993, por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Previa separación mediante cromatografía con columna de gel de sílice hidratado, la cuantificación se efectúa directamente mediante cromatografía de gases con columna capilar, adicionando como patrón interno laurilaraquidato (C<sub>32</sub>).

### Reactivos:

- Patrón interno: Laurilaraquidato al 0,1% (m/v) C<sub>32</sub> PAI (Aldrich, Madrid – España).
- Silicagel 60 para cromatografía en columna PA (Merck).
- Sudan I PA (Aldrich).
- n-Hexano ACS (Panreac, Barcelona – España).
- Éter dietílico (Panreac).
- n-Heptano HPLC PAI (Panreac).
- Etanol absoluto (Panreac).
- Nitrógeno comprimido (Air-liquide, Alpha Gaz, Madrid – España).
- Hidrógeno puro de calidad para cromatografía de gases.
- Aire puro de calidad para cromatografía de gases.
- Gas portador: hidrógeno puro de calidad para cromatografía de gases.

### Preparación de los reactivos:

- Sudán I 1% en hexano: se pesa 1 g de Sudan I y se disuelve en 100 mL de n-hexano para cromatografía.
- Gel de sílice con granulometría comprendida entre 60 y 200 µm. El gel se introduce en el horno a 500°C durante 4 horas. Se enfría y se añade el 2% de agua referido a la cantidad de gel de sílice empleado, se agita vigorosamente para homogeneizar la masa y se mantiene protegido de la luz durante 12 horas antes de usarlo.

- Disolución de patrón interno laurilaraquidato 0,1% (m/v) en hexano: se pesa 0,1 g del patrón interno y se disuelve en 100 mL de hexano.
- Disolvente para elución n-hexano:éter dietílico (99:1 v/v). La mezcla debe prepararse a diario.

**Material:**

- Columna de vidrio para cromatografía de 15 mm de diámetro interno y 40 cm de longitud, Pobel (Madrid, España).
- Varilla de teflón.
- Balanza de precisión de sensibilidad de 0,1 miligramo, Mettler mol. AE-200 (Mettler, Toledo).
- Baño de agua termostatzado P-Selecta® (Barcelona, España).
- Rotavapor 144 Büchi (Suiza).
- Horno termostatzado para las columnas.
- Microjeringa de 5 µL (Hamilton).

**Aparatos:**

- Cromatógrafo de gases, provisto de un sistema de Inyección directa de la muestra en la columna modelo ECD 800 Fisons Instruments, con sistema inyector en frío y detector de ionización de llama, columna capilar Zebron zb5, 15 m, 0,32 mm de diámetro interno y con recubrimiento interno de SE-52 o SE-54 líquido o equivalente, de un espesor de 0,25 µm.

**Procedimiento:****Preparación de la muestra:**

Se aplica la técnica descrita por el Consejo Oleícola Internacional para la determinación del contenido en ceras en aceites de oliva virgen extra (COI/T.20/DOC. nº 18, 2003) y empleada posteriormente por diversos autores como Pérez-Camino *et al.* (2003).

**Preparación de la columna cromatográfica y separación de ceras:**

- Se coloca un algodón en el extremo inferior de la columna.
- Se suspenden 15 g del gel de sílice en 10 mL de n-hexano y se introducen en la columna, en la que previamente se han adicionado 10 mL de n-hexano. Producida la sedimentación espontáneamente, se completa golpeando la columna con una varilla de teflón para que el lecho cromatográfico sea más homogéneo. Se deja eluir el n-hexano y se añaden 30 mL de n-hexano para eliminar posibles impurezas.

- Se pesan en un matraz de 25 mL, 500 mg de la muestra de aceite a analizar, y se adiciona 0,3 mL de patrón interno.
- A continuación se transfiere la muestra preparada a la columna cromatográfica, con ayuda de dos porciones de 2 mL de disolvente de elución y se añaden 3 gotas de la solución Sudán I al matraz que contiene el aceite.
- Se deja fluir el solvente hasta que se sitúe a 1 mm por encima del nivel del gel de sílice. A continuación se añade el disolvente de elución cuando el Sudán I se localiza a 1 cm aproximadamente del algodón. La elución se dará por finalizada un momento antes de que la franja coloreada comience a eluir. El uso del indicador permite por una parte, determinar el punto final de la elución ya que tiene un factor de resolución (RF) en estas condiciones, comprendido entre el correspondiente a las fracciones a separar; por otra, comprobar que la compactación realizada en el proceso de rellenado de la columna fue uniforme.
- Se seca la fracción resultante en rotavapor hasta la práctica eliminación del disolvente, y se lleva a completa sequedad con una corriente débil de nitrógeno.
- Finalmente se adicionan 5 mL de n-heptano, y se analiza mediante cromatografía de gases en las condiciones descritas en la **Tabla 13**.

**Condiciones cromatográficas:**

<b>Tabla 13.</b>			
<b>Condiciones instrumentales para la determinación de ceras en aceite de argán por cromatografía de gases.</b>			
<b>T<sup>a</sup> detector:</b> 350°C			
<b>Gas portador:</b> hidrógeno a presión constante de 25 Kpa			
<b>Velocidad gas portador:</b> 20 – 35 cm/seg			
<b>Volumen de sustancia inyectada:</b> 0,5 – 1 µL de la solución en n-heptano			
<b>Tiempo total del análisis:</b> 60 minutos			
<b>Velocidad del papel:</b> 30 cm/hora			
<b>Sensibilidad instrumental:</b> 4 – 16 veces la atenuación mínima			
<b>Temperatura de la columna</b>			
Etapa	T <sup>a</sup> , °C	t permanencia, minutos	Rampa
T <sup>a</sup> (1): inicial	80	1	20°C/min
T <sup>a</sup> (2): segunda	240	17,5	5°C/min
T <sup>a</sup> (3): tercera	325	6	20°C/min
T <sup>a</sup> (4): final	340	10	

**Identificación y cuantificación de las ceras:**

La identificación de cada uno de los picos correspondientes a las ceras se efectúa en función de los tiempos de retención y por comparación con mezclas de ceras analizadas en idénticas condiciones. Las ceras que se encuentran con más frecuencia son las de C<sub>40</sub>, C<sub>42</sub>, C<sub>44</sub> y C<sub>46</sub>. Se identifican gracias al empleo del patrón interno (C<sub>32</sub>).

**Expresión de resultados:**

El contenido expresado en mg/Kg de materia grasa, se calcula:

$$Ceras = A_x \times m_s \times \frac{1000}{A_s \times m}$$

siendo:

$A_x$  = área del pico de cada uno de los ésteres, en milímetros cuadrados.

$A_s$  = área del pico del patrón interno, en milímetros cuadrados.

$m_s$  = peso del patrón interno, en miligramos.

$m$  = peso de la muestra de aceite, en gramos.



## 7. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES

### 7.1. Polifenoles totales

#### Objetivo:

Determinar el contenido de polifenoles totales en las muestras de aceite de argán, aplicando el método de Folin-Ciocalteu.

#### Fundamento:

El conjunto de los compuestos fenólicos del aceite se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual se reduce dando una mezcla de óxido de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y óxido de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) de color azul.

#### Reactivos:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Ácido gálico.
- Carbonato sódico.
- n-hexano.
- Metanol.

#### Material:

- Matraces aforados de 100 mL y 50 mL.
- Pipetas aforadas de 1, 10, 20 y 50 mL.
- Pipetas de 5 y 20 mL.
- Matraces erlenmeyer.
- Ampollas de decantación.

#### Instrumental:

- Espectrofotómetro Model S-22 UV-Vis (Boeco).
- Cubetas de plástico.

#### Preparación de la recta de calibrado:

La recta de calibrado se prepara a partir de una disolución de ácido gálico de 0,5 g/L tomando volúmenes de 10, 20, 30 y 50 mL de esta disolución y enrasando hasta 100 mL con agua bidestilada desionizada; de este modo se obtienen disoluciones de 50, 100, 150 y 250 mg/L, respectivamente. A continuación, de cada una de estas disoluciones, se toma

1 mL y se introduce en un matraz aforado de 100 mL. Se adicionan 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. Se agita la mezcla y se enrasa con agua bidestilada desionizada hasta 100 mL. Transcurridos 30 minutos se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 725 nm utilizando agua bidestilada desionizada como blanco.



**Figura 38.** Preparación de la recta de calibrado y lectura de polifenoles totales en espectrofotómetro ultravioleta-visible.

#### **Procedimiento:**

Se pesan con exactitud, en un matraz erlenmeyer unos 15 g de aceite. Se adicionan 20 mL de hexano, agitando vigorosamente la mezcla hasta que el aceite se disuelva completamente. La mezcla se transfiere a una ampolla de decantación, procediendo a la extracción con una mezcla de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (40:60) utilizando un volumen total de 50 mL fraccionando en tres volúmenes de 15, 15 y 20 mL. La agitación de la mezcla en la ampolla debe hacerse con suavidad, a fin de evitar emulsiones. Las 3 alícuotas de la extracción se transfieren a un matraz aforado de 50 mL enrasando con la mezcla  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ . De esta disolución se toma 1 mL y se introduce en un matraz aforado de 100 mL, adicionando a continuación, 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. Se enrasa con agua bidestilada desionizada, se agita y se deja reposar 30 minutos. La lectura se realiza (al igual que los patrones) a 725 nm frente a agua bidestilada desionizada como blanco.

**Expresión de los resultados:** Los resultados obtenidos en función de la recta de calibrado, se expresarán en mg/Kg en ácido gálico.

## **7.2. Tocoferoles**

La vitamina E se ha determinado según la norma UNE-EN ISO 9936:2006 “Determinación del contenido de tocoferol y tocotrienol mediante cromatografía líquida de alta resolución”.

Esta norma especifica un método para la determinación del contenido de los tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  en grasas animales y aceites vegetales comestibles mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

**Objetivo:**

Determinar el contenido en  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  y  $\delta$ -tocoferol de las muestras de aceite de argán.

**Fundamento:**

Se disuelve una porción de aceite en n-hexano y los distintos tocoferoles se separan y cuantifican mediante cromatografía líquida de alta resolución.

**Reactivos:**

Todos los reactivos utilizados son de calidad adecuada para HPLC.

- Patrones de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol.
- Metanol.
- n-hexano.
- Isopropanol.
- Fase móvil para HPLC: 99,5% hexano + 0,5% isopropanol.

**Material:**

- Probeta, de 1000 mL de capacidad.
- Pipetas volumétricas, de 5 mL, 10 mL y 20 mL de capacidad.
- Matraces aforados, de 50 mL y 25 mL de capacidad.
- Matraces de fondo redondo de vidrio de color ámbar, de 25 mL.

**Instrumental:**

- Sistema HPLC, compuesto por una bomba de alta presión (Waters 2695), un detector de fluorescencia con longitud de onda establecida a 290 nm y emisión de longitud de onda a 330 nm (Alliance).
- Columna analítica HPLC, 250 mm x 4 mm, con micropartículas de sílice con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m (Lichrosob SI 60).
- Espectrofotómetro UV.
- Rotavapor.

### Preparación de la recta de calibración:

Se prepara una disolución “madre” de cada uno de los tocoferoles pesando  $10 \pm 1$  mg de su correspondiente patrón, se introduce en un matraz aforado de 50 mL y se diluye hasta enrase con n-hexano. Se toman 5 mL de esta disolución en un matraz ámbar de fondo redondo y se elimina todo el n-hexano a vacío en el rotavapor a una temperatura no superior a 40°C. Es importante retirar el matraz del rotavapor tan pronto como todo el disolvente haya sido eliminado. Se adicionan al matraz 10 mL de metanol y se agita hasta disolución del residuo.

Se mide la absorbancia de esta disolución a la longitud de onda apropiada dentro del rango comprendido entre 270 y 310 nm, usando el espectrofotómetro UV, con una cubeta de cuarzo de una longitud de 10 mm de paso óptico. La absorbancia medida debe oscilar entre los valores de 0,2 y 0,8. Se calcula la concentración (en microgramos por mililitro) dividiendo el valor de la absorbancia por el factor correspondiente indicado en la **Tabla 14**.

<b>Tabla 14.</b>		
<b>Factores de división para el cálculo de la concentración de tocoferoles.</b>		
Longitud de onda (nm)	Tocoferol	Factor de división
292	$\alpha$ -tocoferol	0,0076
296	$\beta$ -tocoferol	0,0089
298	$\gamma$ -tocoferol	0,0091
298	$\delta$ -tocoferol	0,0087

Para la obtención de cada disolución patrón, se mezclan volúmenes apropiados de las disoluciones madre de calibración y se diluyen con n-hexano para obtener una solución que contenga entre 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$  de cada patrón. Estas disoluciones tienen que estar recién preparadas y se deben proteger de la luz y almacenar a una temperatura entre 0°C y 4°C.

A continuación se bombea la fase móvil con un flujo de 1 mL/min durante al menos 30 minutos para acondicionar la columna y se inyectan unos 10  $\mu\text{L}$  de la disolución patrón ajustando la velocidad para conseguir las siguientes condiciones:

- Tiempo de retención de  $\alpha$ -tocoferol: entre 8 y 12 minutos.
- Factor de resolución (RF), para la separación del  $\beta$ - y  $\gamma$ -tocoferol no inferior a 1,0; el RF se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$RF = \frac{d_r(I) - d_r(II)}{0,5 * [b(I) + b(II)]}$$

donde

$d_r(\text{I})$ : distancia de retención del  $\gamma$ -tocoferol;

$d_r(\text{II})$ : distancia de retención del  $\beta$ -tocoferol;

$b(\text{I})$ : anchura de la base del pico del  $\gamma$ -tocoferol;

$b(\text{II})$ : anchura de la base del pico del  $\beta$ -tocoferol.

Seleccionados los parámetros óptimos de los sistemas de detección e integración, se procede al estudio de la reproducibilidad del método.

**Preparación de muestra:** Dependiendo de la concentración de tocoferoles, se pesan con una aproximación de 1 mg,  $0,25 \pm 0,1$  g de la muestra en un matraz aforado de 25 mL. Se añade una cantidad de hexano, agitando hasta disolver la muestra y se diluye hasta enrase con el mismo disolvente.

**Procedimiento:**

A continuación, se inyectan 10  $\mu\text{L}$  de la muestra en la columna y se identifican los tocoferoles presentes teniendo como referencia los cromatogramas de calibración. Se registran las áreas de los picos.

**Expresión de los resultados:**

El contenido en  $\alpha$ -tocoferol,  $W$ , de la muestra, expresado en mg/Kg, se obtiene por la fórmula:

$$W = \frac{P \times \bar{A}_t \times V}{\bar{A}_s \times m}$$

Siendo:

$P$ : concentración de  $\alpha$ -tocoferol de la disolución patrón, en microgramos por mililitro.

$\bar{A}_s$ : media de las áreas de los picos obtenidos con el patrón de  $\alpha$ -tocoferol.

$\bar{A}_t$ : media de las áreas de los picos de  $\alpha$ -tocoferol obtenidos en la muestra para análisis.

$m$ : masa, en gramos, de la muestra para análisis.

$V$ : volumen de la disolución para análisis ( $V=25$  mL).

Los contenidos del resto de los tocoferoles en la muestra para análisis se calculan de la misma manera, utilizando los datos obtenidos con los patrones correspondientes.

### 7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante total del aceite de argán

#### Objetivo:

Evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de aceite de argán empleando 3 métodos diferentes: ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)}, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).

#### Muestras:

El estudio de la capacidad antioxidante se ha realizado en el total de muestras de aceite de argán (salvo las muestras nº 10, 11 y 18, por no disponer de cantidad suficiente para los ensayos).

#### Procedimiento de extracción de los compuestos antioxidantes:

Se han ensayado los 3 métodos antes mencionados en un extracto metanólico del aceite de argán (Ver **Figura 39**). Además, el método ABTS se ha ensayado directamente en el aceite diluido en n-hexano.

#### Reactivos:

- n-hexano (Panreac).
- Metanol (Merck).

#### Material:

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g, Mettler AE-200 (Mettler Instrument).
- Micropipetas Eppendorf®, 100 –1000 µL.
- Pipetas Pasteur 5 mL.
- Pipetas y matraces aforados.
- Tubos de centrifuga.
- Centrífuga Sorvall® TC.
- Agitador Vibromatic Digiterm 3000542 P (Selecta).

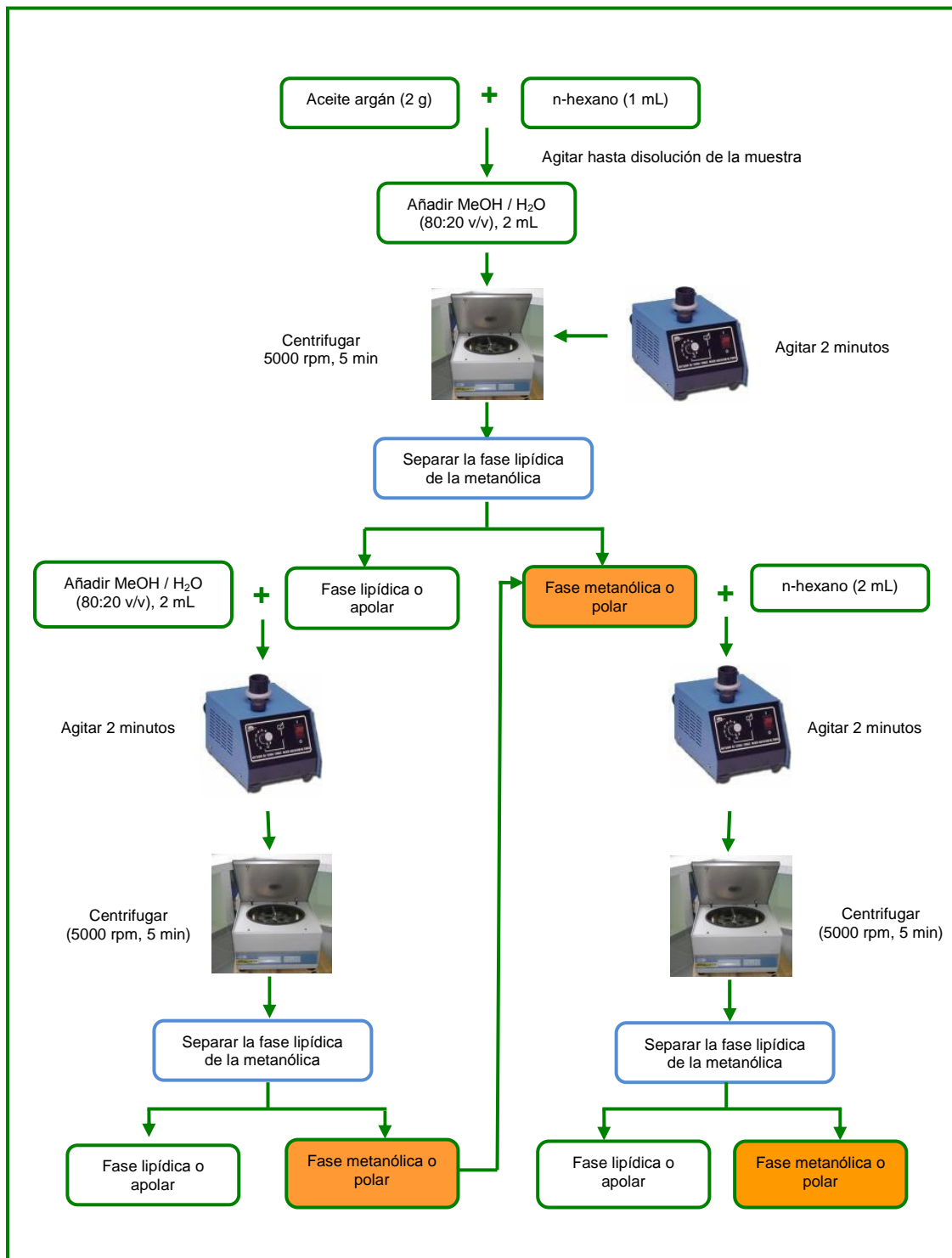
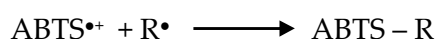
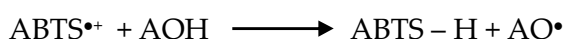


Figura 39. Procedimiento de extracción de compuestos antioxidantes en las muestras de aceite de argán.

### 7.3.1. Método ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)}

#### Fundamento:

El método se basa en la inhibición por el antioxidante problema de la absorbancia producida por el radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$ , que es un compuesto cromóforo muy estable, soluble en agua y con un máximo de absorción a 734 nm. Esta absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AOH) o de un radical ( $R^{\bullet}$ ):



El proceso que tiene lugar consiste en que se forma primero el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable. Al añadir las sustancias antioxidantes presentes en el aceite de argán, la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de absorbancia producido. Se cuantifica empleando una curva de calibrado que relaciona el porcentaje de pérdida de absorbancia y la concentración del antioxidante de referencia (Trolox).

A continuación se describe el método ABTS aplicado a las muestras: a) extracto metanólico del aceite (**Figura 39**) y b) directamente en el aceite diluido en n-hexano.

#### a. Método ABTS - extracto metanólico del aceite de argán

Según el método descrito por Prior *et al.* (2005).

#### Reactivos:

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox) (Aldrich).
- Sal amónica del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Fluka Chemicals).
- Persulfato potásico (Panreac).
- Fosfato monosódico (Panreac).

#### Material:

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g, Mettler AE-200 (Mettler Instrument).
- Micropipetas Eppendorf®, 10 – 100  $\mu$ L; 100 –1000  $\mu$ L.



**Instrumental:**

- Espectrofotómetro Model S-22 UV-Vis (Boeco).
- Cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor Hellma®.

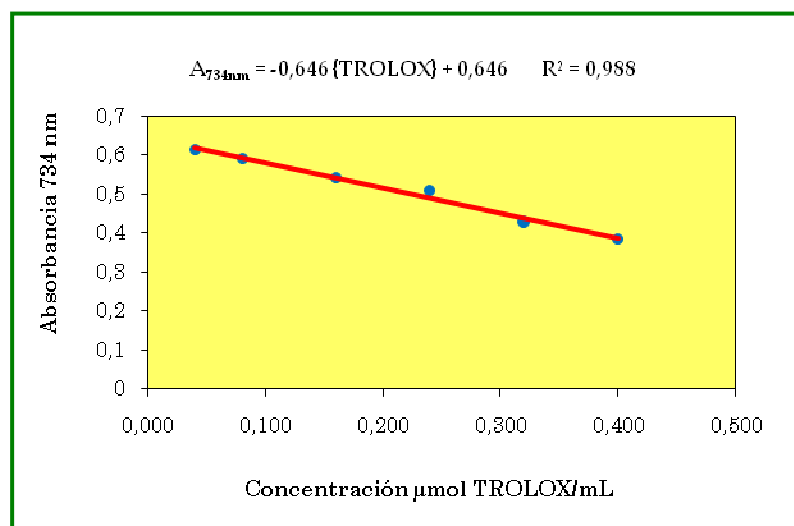
**Preparación de los reactivos:**

- **Disolución de ABTS 7mM:** se pesan 38,4 mg de sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelven hasta un volumen de 10 mL con agua bidestilada desionizada.
- **Disolución de persulfato potásico 2,45 mM:** se pesan 66,2 mg de  $K_2S_2O_8$  y se disuelven hasta un volumen de 100 mL con agua bidestilada desionizada.
- **Tampón fosfato 5 mM, pH=7,4:** se pesan 0,89 g de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  y se disuelven en agua bidestilada desionizada hasta un volumen de 1 L. Posteriormente se ajusta el pH hasta 7,4 con HCl o NaOH, según sea necesario.
- **Preparación radical ABTS•<sup>+</sup>:** se hace reaccionar el ABTS y el persulfato potásico a volúmenes iguales. Se parte de una concentración de 10 mL de ABTS 7 mM y de 10 mL de  $K_2S_2O_8$  2,45 mM; la reacción estequiométrica es de 1:1. La oxidación del ABTS es inmediata, pero la absorbancia máxima y estable no se alcanza hasta 6 horas después. La mezcla se puede mantener estable en oscuridad durante 12 – 16 horas a temperatura ambiente. El radical catiónico es estable durante 2 días, almacenado en oscuridad.
- **Preparación de la disolución ABTS•<sup>+</sup>:** la disolución ABTS•<sup>+</sup> se mezcla con tampón fosfato, hasta que su absorbancia a 734 nm sea de  $0,70 \pm 0,02$ , medida en cubetas de cuarzo de 10 mm a 30°C. Las cantidades aproximadas que pueden dar esta absorbancia son 40  $\mu$ L de la disolución de ABTS•<sup>+</sup> y 3 mL de tampón fosfato. En el caso de que la absorbancia esté por encima de ese valor, se diluirá con el tampón. Si la absorbancia está por debajo, se añadirá disolución de ABTS•<sup>+</sup>, hasta que la señal sea la adecuada. Se hace el espectro del ABTS•<sup>+</sup>:tampón fosfato desde 250-900 nm. Se emplea el tampón fosfato como blanco (Delgado-Andrade *et al.* 2005).

### Preparación de la recta de calibración:

La determinación de la capacidad antioxidante se realiza por medio de una curva de calibrado que relaciona el porcentaje de pérdida de absorbancia y la concentración de Trolox como antioxidante.

Se prepara una disolución madre de Trolox 4 mM, pesando 10 mg de Trolox y adicionando unas gotas de metanol hasta disolución completa del mismo, se enrasa con agua bidestilada desionizada hasta un volumen final de 10 mL. A partir de esta disolución madre, se preparan los distintos puntos que integrarán la recta, con concentraciones comprendidas entre 0,04 y 0,4  $\mu\text{mol}$  Trolox/mL. Las diluciones se preparan por triplicado. Cada punto de la recta se prepara igual que las muestras, es decir, poniendo 20  $\mu\text{L}$  de cada dilución y 2 mL de la disolución ABTS<sup>•+</sup>. Se agita durante 30 segundos y posteriormente, se deja en oscuridad a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a los 30 minutos exactos, obteniendo así el valor de la absorbancia final. La correspondiente recta de calibrado aparece en la **Figura 40**.



**Figura 40.** Recta de calibrado con Trolox en el método ABTS.

### Medida de la capacidad antioxidante de las muestras:

Se toman 2 mL de la disolución de ABTS<sup>•+</sup> y se mezclan con 20  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico de la muestra de aceite de argán a ensayar. Posteriormente, se agita durante 30 segundos y se mide la absorbancia a 734 nm a los 30 minutos. Todas las medidas se han realizado por triplicado.

## b. Método ABTS - aceite diluido en n-hexano

Según el método descrito por Samaniego *et al.* (2007) para determinar la capacidad antioxidante en aceite de oliva virgen.

### Reactivos:

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox) (Aldrich).
- Sal amónica del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Fluka Chemicals).
- Persulfato potásico (Panreac).
- Etanol (Merck).
- n-hexano (Panreac).

### Material:

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g, Mettler AE-200 (Mettler Instrument).
- Micropipetas Eppendorf®, 10 – 100 µL; 100 –1000 µL.

### Instrumental:

- Espectrofotómetro Model S-22 UV-Vis (Boeco).
- Cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor Hellma®.

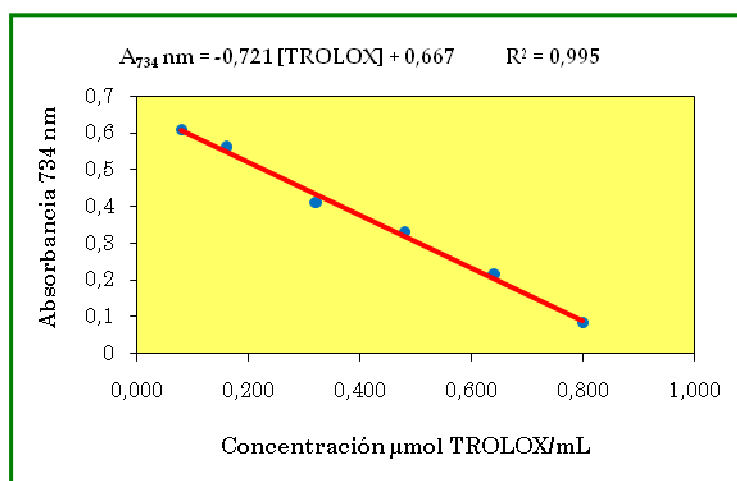
### Preparación de los reactivos:

- **Disolución ABTS 7mM:** se pesan 0,096 g de sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelven hasta 25 mL de agua bidestilada desionizada.
- **Disolución de persulfato potásico:** para conseguir una concentración final 140 mM, se pesan 0,945 mg de  $K_2S_2O_8$  y se disuelven hasta un volumen de 25 mL de agua bidestilada desionizada.
- **Preparación del radical ABTS•<sup>+</sup>:** se hace reaccionando el ABTS y el persulfato potásico. Se parte de un volumen de 5 mL de ABTS 7 mM y de 88 mL de  $K_2S_2O_8$  140 mM; la reacción estequiométrica es de 1:0,5. La oxidación del ABTS es inmediata, pero la absorbancia máxima y estable no se alcanza hasta las 6 horas; la mezcla se mantiene estable en oscuridad de 12 – 16 horas a temperatura ambiente. El radical catiónico es estable durante 2 días, almacenado en oscuridad.

- **Preparación de la disolución de ABTS<sup>•+</sup>:** la disolución ABTS<sup>•+</sup> se mezcla con etanol (1:112), hasta que su absorbancia a 734 nm sea de  $0,70 \pm 0,02$ , medida en cubetas de cuarzo de 10 mm a una temperatura de 30°C. En el caso de que la absorbancia esté por encima de ese valor, la mezcla se diluye con etanol. Si la absorbancia está por debajo, se añade disolución de ABTS<sup>•+</sup>, hasta que la señal sea adecuada. Se hace el espectro del ABTS<sup>•+</sup>:etanol desde 250-900 nm. Se emplea etanol para ajustar el blanco (Samaniego *et al.* 2007).

#### Preparación de la recta de calibración:

Se prepara una disolución madre de Trolox 4 mM, pesando 10 mg de Trolox y adicionando unas gotas de metanol hasta disolución completa del mismo. Después se enrasa con agua bidestilada desionizada hasta un volumen final de 10 mL. A partir de esta disolución madre, se preparan los distintos puntos que integrarán la recta de calibrado, con concentraciones comprendidas entre 0,08 y 0,8  $\mu\text{mol}$  Trolox/mL. Las diluciones se preparan por triplicado. Cada punto de la recta se prepara igual que las muestras, es decir, poniendo 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución y 2 mL de la disolución ABTS<sup>•+</sup>, se agita durante 30 segundos. Posteriormente, se deja en oscuridad a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a los 30 minutos exactos, obteniendo así el valor de absorbancia final. La correspondiente recta de calibrado aparece en la **Figura 41**.



**Figura 41.** Recta de calibrado con Trolox en el método ABTS.

#### Medida de la capacidad antioxidante de las muestras:

Se toman 2 mL de la disolución ABTS<sup>•+</sup> y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la muestra de aceite de argán a ensayar a una dilución 1:4 en n-hexano. Posteriormente, se

mezcla bien durante 30 segundos y se mide la absorbancia a 734 nm a los 30 minutos. Todas las medidas se han realizado por triplicado.

#### Expresión de los resultados:

Los resultados obtenidos por los métodos descritos en el apartado a) y b) se expresan en forma de un índice, el valor TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox). Dicho valor se define como los mmoles de Trolox que tienen la misma capacidad antioxidante que 1 Kg de la muestra a ensayar.

### 7.3.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

#### Fundamento:

Se emplea un radical coloreado, el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), en disolución metanólica. El DPPH• se comercializa como radical estable. Se sigue como referencia el método descrito por Morales y Jiménez-Pérez (2001), con algunas modificaciones (Delgado-Andrade *et al.* 2005). El radical DPPH• tiene un máximo de absorción a 520 nm, pero dicha absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AOH) o de un radical (R•):



En general, el radical formado a partir del antioxidante (AO•) es más estable; también puede producirse una reacción radical-radical que da origen a una molécula estable (Valavanidis *et al.* 2004). Mediante este método se evalúa la actividad antioxidante de la fase metanólica o fracción polar, previamente obtenida de las muestras de aceite de argán, que contiene algunos de los compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos) (**Figura 39**).

#### Reactivos:

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox) (Aldrich).
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma).
- Metanol (Merck).

#### Material:

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g, Mettler AE-200 (Mettler Instrument).
- Micropipetas Eppendorf®, 10 – 100 µL; 100 –1000 µL.

**Instrumental:**

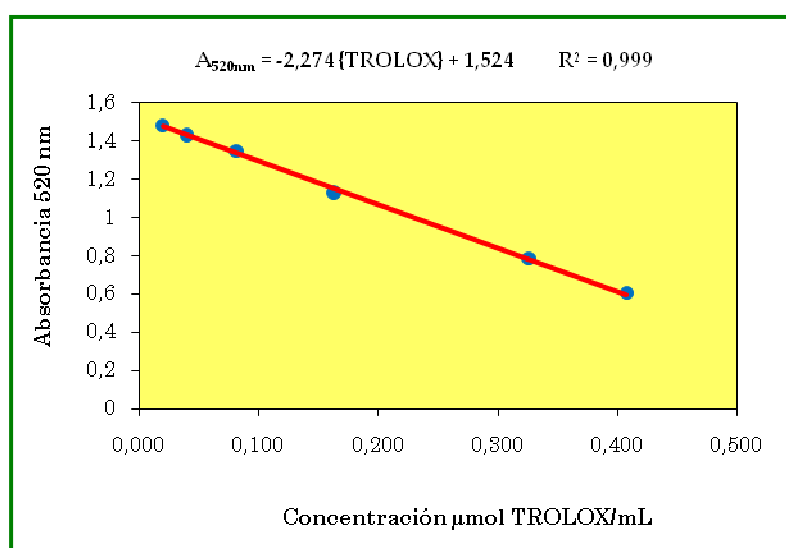
- Espectrofotómetro Model S-22 UV-Vis (Boeco).
- Cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor Hellma®.

**Preparación de los reactivos:**

- **Preparación de la disolución del radical DPPH• (74 mg/mL):** se pesan 7,4 mg de DPPH• y se disuelven en 100 mL de metanol. La disolución preparada es estable durante 12 h a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- **Preparación de la disolución de trabajo DPPH•:** esta disolución debe prepararse a diario. Se diluye con metanol hasta que la medida en el espectrofotómetro a 520 nm se sitúa en 1,8 unidades de absorbancia. El ajuste del instrumento se fija con metanol.

**Preparación de la recta de calibración:**

Utilizando Trolox en metanol se prepara una disolución madre 4 mM. Posteriormente se preparan diluciones entre 0,005-0,5  $\mu$ moles Trolox/mL. Cada punto de la recta se prepara igual que las muestras, es decir poniendo 400  $\mu$ L de las diferentes concentraciones de Trolox y 3 mL de la disolución DPPH•. Se agita la mezcla durante 30 segundos y se deja en oscuridad a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia a 520 nm transcurridos 60 minutos. Se obtiene así, el valor de absorbancia final. La correspondiente recta de calibrado aparece en la **Figura 42**.



**Figura 42.** Recta de calibrado con Trolox en el Método DPPH.

### Medida de la capacidad antioxidante de las muestras:

Se trabaja directamente con el extracto metanólico del aceite (**Figura 39**). Se toman 3 mL del radical DPPH• y se añaden a 400 µL del extracto metanólico del aceite a ensayar. Se agita y se deja en oscuridad a temperatura ambiente, procediendo a la medida de su absorbancia a los 60 minutos, una vez alcanzado el equilibrio (Keceli *et al.* 2001). Todas las medidas se han realizado por triplicado.

### Expresión de los resultados:

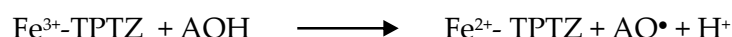
Los resultados obtenidos por el método DPPH se expresan en forma del índice TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox). Dicho valor se define como los mmoles de Trolox que tienen la misma capacidad antioxidante que 1 Kg de la muestra a ensayar.

### 7.3.3. Método FRAP

#### Fundamento:

Determinación de la capacidad de la muestra de reducir el hierro de su forma férrica hasta su forma ferrosa, de acuerdo al procedimiento descrito por Benzie y Strain (1996), con algunas modificaciones (Pulido *et al.* 2000). Se utilizan los extractos metanólicos de las muestras de aceite de argán (**Figura 39**).

El hierro en su forma férrica no da coloración con el complejo tripiridiltriazina (TPTZ), pero la forma ferrosa forma un complejo de color azul intenso con una absorción máxima a 595 nm.



#### Reactivos:

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox) (Aldrich).
- Ácido clorhídrico (Panreac).
- 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triacina (TPTZ) (Fluka Chemicals).
- Cloruro férrico (Panreac).
- Acetato de sodio (Panreac).

#### Material:

- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g, Mettler AE-200 (Mettler Instrument).

- Micropipetas Eppendorf®, 10 – 100  $\mu\text{L}$ ; 100 –1000  $\mu\text{L}$ .
- Baño de agua termostatzado Digiterm 3000542 P (Selecta).

**Instrumental:**

- Espectrofotómetro Model S-22 UV-Vis (Boeco).
- Cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor Hellma®.

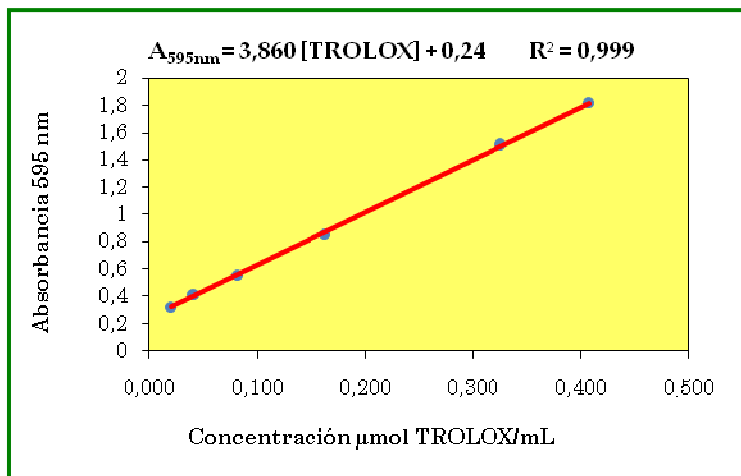
**Preparación de los reactivos:**

- **Disolución de ácido clorhídrico 40 mM:** se toman 535  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 37% y se disuelven en agua bidestilada desionizada hasta un volumen final de 100 mL. Esta disolución puede conservarse hasta una semana.
- **Disolución de TPTZ 10 mM:** se pesan 31,2 mg de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triacina (TPTZ) y se disuelven en agua bidestilada desionizada hasta un volumen final de 10 mL. Esta disolución puede conservarse de forma estable hasta una semana.
- **Disolución de cloruro férrico 20 mM:** se pesan 135,2 mg de  $\text{FeCl}_3$  y se disuelven en 25 mL de agua bidestilada desionizada. Esta disolución se preparará a diario.
- **Tampón acetato de sodio 0,3 mM, pH=3,6:** se pesan 6,1 mg de acetato de sodio y se disuelven hasta un volumen de 250 mL con agua bidestilada desionizada. Posteriormente se ajusta el pH hasta 7,4 con HCl o con NaOH, según sea necesario.
- **Disolución FRAP:** se mezclan 2,5 mL de la disolución TPTZ 10 mM, 2,5 mL de la disolución de cloruro férrico 20 mM y 25 mL del tampón acetato de sodio 0,3 mM. La mezcla se conservará a 37°C en baño de agua termostatzado.

**Preparación de la recta de calibración:**

Se prepara una disolución madre 4 mM y posteriormente se preparan diluciones de 0,005-0,5  $\mu\text{moles Trolox/mL}$  en agua bidestilada desionizada. Cada punto de la recta (**Figura 43**) se prepara poniendo 120  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de Trolox y 900  $\mu\text{L}$  de la disolución FRAP, se agita durante 30 segundos. Posteriormente, se mantiene en baño termostatzado a 37°C y se mide la absorbancia a 595 nm a los 30 minutos exactos; se obtiene así el valor de la absorbancia final.





**Figura 43.** Recta de calibrado con Trolox en el método FRAP.

#### Medida de la capacidad antioxidante de las muestras:

Se toman 900  $\mu\text{L}$  de la disolución FRAP, conservada a 37°C y se mezclan con 120  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico del aceite a ensayar, atemperados a 37°C. Previamente se realizan ensayos con diferentes concentraciones de la muestra para comprobar que la mezcla produzca una señal válida, añadiendo 90  $\mu\text{L}$  de muestra y 30  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada desionizada o bien 60  $\mu\text{L}$  de muestra y 60  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada desionizada. La mezcla se agita y se mantiene a 37°C en el baño termostatzado, procediendo a la medida de su absorbancia a 595 nm a los 30 minutos exactos. Todas las medidas se han realizado por triplicado. El blanco se prepara con 900  $\mu\text{L}$  de FRAP y 120  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada desionizada.

#### Expresión de los resultados:

Los resultados obtenidos por el método FRAP se expresan como valor TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox), que se define como los mmoles de Trolox que tienen la misma capacidad antioxidante que 1 Kg de la muestra a ensayar.

## 8. INDUCCIÓN DE LA COLITIS Y DETERMINACIÓN DEL DAÑO COLÓNICO

### Animales de experimentación:

Los animales utilizados en este estudio son ratas albinas hembra de la cepa Wistar con peso comprendido entre 180 y 200 g, suministradas por Harlan Interfauna Ibérica SL (Barcelona). Los animales se mantienen en el estabulario del laboratorio durante 7 días antes de llevar a cabo el experimento, a una temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas se alojan en cubetas de makrolon con lecho de viruta, dispuestas en estanterías de acero inoxidable, en grupos de 6 ratas para los grupos de colitis y de 3 ratas para los grupos control. Estos estudios se han realizado de acuerdo con las directivas de la Convención para la protección de los animales vertebrados usados en experimentación y con otros fines científicos, establecidas por la Unión Europea (85/ETS123; 86/609/EEC).

### Dietas:

Se utilizan 3 dietas distintas que varían sólo en la procedencia de su grasa (10% m/m): aceite de oliva virgen extra (O), aceite de girasol refinado (G) y aceite de argán virgen (A). La dieta base (Ref. TD99040) es elaborada por Harlan (Barcelona). Esta dieta no contiene grasa y está preparada para adicionar un 10% (m/m) de aceite. Los distintos aceites son añadidos y mezclados con la dieta base en el laboratorio. La composición de la dieta base y la composición en ácidos grasos de los distintos aceites se muestran en las **Tablas 15** y **16**, respectivamente. Se utiliza la muestra nº 14 de aceite de argán, obtenida por el método tradicional, para llevar a cabo estos experimentos.

**Tabla 15.**  
Composición de la dieta utilizada.

Componente	g/Kg
Caseína	222,222
L-cisteína	3,333
Almidón de maíz	408,302
Maltrodextrina	146,67
Sacarosa	111,11
Celulosa	55,56
Mezcla mineral, AIN93G-MX	38,89
Mezcla vitamínica AIN-93-VX	11,111
Bitartrato de colina	2,78
Antioxidante, BTHQ <sup>a</sup>	0,022

<sup>a</sup>BTHQ: Butilhidroquinona.

**Tabla 16.**  
Composición en ácidos grasos (%) de los distintos aceites vegetales comestibles utilizados en el estudio.

Ácido graso	Aceite de argán virgen (muestra nº 14)	Aceite de oliva virgen extra	Aceite de girasol
Mirístico	0,16	0,03	0,07
Palmítico	13,43	9,99	6,35
Palmitoleico	0,16	0,70	0,02
Margárico	0,07	0,05	0,03
Margaroleico	0,02	0,09	0,03
Estearico	6,60	4,96	3,72
Oleico	44,97	77,32	28,87
Linoleico	33,08	4,05	58,11
Aráquico	0,38	0,47	0,27
$\alpha$ -Linolénico	0,43	0,53	0,07
Gadoleico	0,4	0,31	0,26
Behénico	0,13	0,17	0,74
Lignocérico	0,15	0,45	0,15

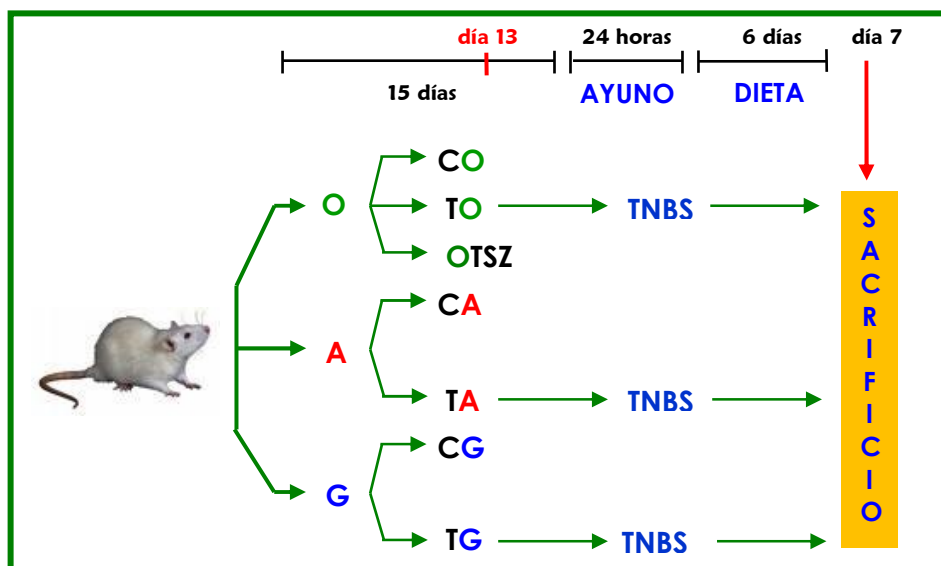
#### Inducción de la colitis experimental:

La colitis se induce utilizando el método descrito por Morris *et al.* (1989) ligeramente modificado. Los animales se someten a un período de ayuno de 24 horas, después del cual son anestesiados ligeramente con halotano, procediéndose a la administración rectal de 0,25 mL de una disolución de 10 mg de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) en etanol al 50% (v/v). La instilación se realiza introduciendo un catéter de teflón (2 mm de grosor) 8 cm desde el ano, manteniendo a los animales en posición supina hasta la recuperación de la anestesia. La disolución de TNBS se prepara a partir de un liofilizado de la disolución comercial de origen consistente en una solución acuosa al 5% m/v. Dado que se han descrito variaciones en la respuesta en función del lote comercial de TNBS (Yamada *et al.* 1992), todos los experimentos se realizan con TNBS de un mismo lote.

#### Diseño experimental:

El diseño experimental se esquematiza en la **Figura 44**. Inicialmente los animales se disponen en tres grupos que son alimentados durante 15 días con dietas que contienen aceite de oliva virgen extra (grupo O), aceite de argán virgen (grupo A) o aceite de girasol (grupo G). El día 13 las ratas del grupo O se clasifican en 3 grupos, un grupo control (grupo CO, n=3), un grupo grupo tratado con TNBS (grupo TO, n=6) y un grupo tratado con TNBS que recibe además sulfasalazina como tratamiento antiinflamatorio de referencia (grupo SZ, n=6). Las ratas de los grupos A y G son divididas en dos grupos cada uno; grupos controles de aceite de argán (grupo CA n=3) y aceite de girasol (grupo

CG, n=3) y grupos colíticos de aceite de argán (TA, n=6) y aceite de girasol (TG, n=6).



**Figura 44.** Diseño experimental. O (grupo aceite oliva virgen extra); CO (grupo control oliva virgen); TO (grupo oliva virgen tratado con TNBS); OTSZ (grupo oliva virgen tratado con TNBS y al que además se le administra sulfasalazina); A (grupo argán virgen); CA (grupo control argán virgen); TA (grupo argán virgen tratado con TNBS); G (grupo girasol); CG (grupo control girasol); TG (grupo girasol tratado con TNBS).

Todas las ratas son alimentadas con la dieta correspondiente durante 15 días, a continuación se mantienen 24 horas en ayunas y se induce la colitis a las ratas de los grupos TNBS tal y como se ha indicado en el apartado anterior. A continuación las ratas siguen recibiendo las distintas dietas durante 6 días más. El séptimo día se procede al sacrificio. Las ratas del grupo OTSZ reciben sulfasalazina (200 mg/Kg/día) mediante sonda nasogástrica desde el día 13 y hasta el final del experimento. Durante el desarrollo de la experiencia se registra diariamente el peso corporal de los animales, así como el consumo global de comida y de agua para cada grupo.

#### Valoración del proceso inflamatorio intestinal:

Las alteraciones intestinales se han caracterizado macroscópicamente y bioquímicamente. Una vez sacrificados los animales por dislocación cervical, se les extrae el colon en su totalidad, observando la existencia o no de adherencias entre intestino grueso y órganos adyacentes. Seguidamente se procede a la limpieza del mismo, retirando los restos de grasa y las adherencias mesentéricas, sobre una placa Petri con hielo. El colon se lava con solución salina isotónica y se determina su longitud bajo una tensión constante de 2 g, así como su peso. Tras abrirlo longitudinalmente, un observador ajeno al desarrollo del experimento valora el daño macroscópico en una escala de 0 a 25 de acuerdo a los

siguientes criterios: adherencias (0-3), obstrucción (0-2), engrosamiento (0-2), hiperemia (0-3), fibrosis (0-3), necrosis (0-5), cicatrización y deformación (0-7) (Daddaoua *et al.* 2005; 2006; 2007; Ballester *et al.* 2007).

Por último, el colon se divide en distintos fragmentos longitudinales que son congelados inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la realización posterior de las determinaciones bioquímicas. Todas las determinaciones se realizan en las dos semanas siguientes al sacrificio de los animales.

#### **Determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica:**

La determinación de la actividad mieloperoxidasa colónica (MPO) se realiza por el método descrito por Krawisz *et al.* (1984). Este enzima se utiliza como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es un enzima estrictamente específico de estos fagocitos.

Los fragmentos de colon se disponen sobre una placa Petri enfriada con hielo y se pican con tijeras durante aproximadamente 15 segundos. A continuación, se homogeneizan en tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5% (m/v) en tampón fosfato salino (50 mM, pH=6,0), con una dilución final de 1:20 (m/v) en un homogeneizador Heidolph durante aproximadamente 45 segundos. El HTAB actúa como detergente, lo cual facilita la liberación del enzima MPO de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, donde se encuentra almacenada. Seguidamente, el homogenado se sonica durante 10 segundos y se somete a un triple proceso de congelación-descongelación que facilita la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo también la liberación del enzima. Después de cada ciclo de congelación y descongelación, los homogenados se sonicen durante 10 segundos. Tras la última descongelación se centrifuga el homogenado a 7000 G durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se procede a la determinación de la actividad MPO siguiendo la cinética de la reacción frente al agua oxigenada. Para ello se añaden 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a 50 mL del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0,167 mg/mL) y peróxido de hidrógeno al 0,0005% (m/v) en tampón fosfato (50 mM, pH=6,0). El incremento de absorbancia se determina a 450 nm. La actividad MPO se calcula por interpolación en una curva patrón, realizada con mieloperoxidasa procedente de neutrófilos humanos. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1  $\mu\text{mol}$ /minuto de peróxido de hidrógeno a  $25^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se expresan como U/mg tejido fresco.

#### **Determinación de la actividad fosfatasa alcalina:**

La determinación de la actividad fosfatasa alcalina (AP) en colon de rata se lleva a cabo por el método de Bessey *et al.* (1946). La AP presente en la muestra cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de un reactivo coloreado, el p-nitrofenilfosfato sódico (5,5

mM) en tampón glicina (50 mM, pH=10,5), que incorpora MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM), dando lugar a p-nitrofenol, molécula que presenta un máximo de absorción a 405 nm. Para realizar el ensayo, se añaden 5 µL del problema a 50 µL de reactivo, se incuba a 37°C durante 30 minutos y se añaden 120 µL de NaOH. Por último, se determina la absorbancia de la disolución resultante a 405 nm y se calcula la actividad AP por interpolación en una curva patrón, realizada con p-nitrofenol. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína (unidades internacionales).

#### **Determinación de la expresión de IL-1β, IL-1ra y TFF3:**

La expresión de IL-1β, IL-1ra y TFF3 se estudia mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El RNA total se extrae utilizando Trizol (Life Technologies, Rockville, EEUU). Para ello, 5 µg de RNA por muestra son retrotranscritos utilizando el kit *First-strand cDNA synthesis* (Amersham Biosciences, Barcelona) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación la reacción de PCR se lleva a cabo utilizando 2 µL de cDNA en un volumen de reacción de 25 µL. La expresión de la subunidad 18S ribosomal se utiliza como control de carga. Los cebadores son: IL-1β (sentido 5'-AAT GAC CTG TTC TTT GAG GCT G-3'; antisentido 5'-CGA GAT GCT GCT GTG AGA TTT GAA G-3'); IL-1ra (sentido 5'-GAG TCA GCT GGC CAC CCT G-3'; antisentido 5'-CAC TGC TTC CCG AAT GTC TGA C-3'); TFF3 (sentido 5'-ATG GAG ACC AGA GCC TTC TG-3'; antisentido 5'-ACA GCC TTG TGC TGA CTG TA-3'); subunidad ribosomal 18S (sentido 5'-CCA TTG GAG GGC AAG TCT GGT G-3'; antisentido 5'-CGC CGG TCC AAG AAT TTC ACC-3').

Inicialmente y con el fin de establecer las condiciones de las reacciones de PCR, se ensayan diferentes cantidades de RNA en una mezcla de muestras y diferente número de ciclos. La temperatura de hibridación para cada reacción de PCR y el número de ciclos, fueron los siguientes: 27 ciclos y 57°C para la amplificación de la IL-1β y la IL-1ra; 23 ciclos y 56°C para la amplificación de TFF3 y 17 ciclos y 60°C (para la subunidad ribosomal 18S). Una vez amplificados, los fragmentos fueron resueltos en geles de agarosa al 2,5% (m/v). Las bandas fueron a continuación teñidas con bromuro de etidio y cuantificadas utilizando el programa *Scion Image del National Institute of Health*.

#### **Determinación de la expresión de ciclooxygenasa-2 (COX2) y Foxp3:**

Los reactivos necesarios para la elaboración de los *Western blots* son suministrados por Biorad (ELAB, Granada), los anticuerpos frente a COX2 son suministrados por Cayman Chemical (Ann Arbor, EEUU) y los de Foxp3 por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EEUU). Los fragmentos colónicos son picados y homogeneizados durante 1 minuto en tampón RIPA con inhibidores de proteasas (1,10-fenantrolina, iodoacetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Posteriormente se centrifugan a 7000 G durante 10 minutos y se determina la concentración proteica en los sobrenadantes utilizando el

método del ácido bicinchonínico, descrito por Smith *et al.* (1985). En este método se usa un colorante con un máximo de absorbancia a 562 nm, que se obtiene mezclando dos reactivos A y B en proporción 50:1 (v/v). El reactivo A consiste en una disolución acuosa de ácido bicinchonínico (2,57 mM) en forma de sal sódica (ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolínico),  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,16 mM), tartrato sódico-potásico (4,12 mM), NaOH (0,1 M) y  $\text{NaHCO}_3$  (132 mM) (pH=11,25). El reactivo B es una disolución acuosa al 40% (m/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Ambos reactivos son estables a temperatura ambiente de forma indefinida. Para realizar la determinación, se añaden a 2  $\mu\text{L}$  del homogenado, 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de coloración y tras incubar a 37°C durante 30 minutos se procede a la lectura espectrofotométrica a 560 nm. El cálculo del contenido de proteínas se realiza por interpolación en una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) fracción V. Los cálculos se expresan en  $\mu\text{g}$  de proteína por  $\mu\text{L}$  de muestra.

Una vez conocida la concentración proteica de los sobrenadantes, éstos son hervidos durante 4 minutos en tampón Laemmli. Cantidades iguales en proteínas de las distintas muestras fueron a continuación sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida – duodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE) y son transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) que son expuestas a sus correspondientes anticuerpos. Las bandas resultantes se detectan por quimioluminiscencia utilizando el reactivo *Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus* (Perkin Elmer, Madrid, España) y se cuantifican con un programa del *National Institute of Health* de Estados Unidos (*Scion Image*).

## 9. DISEÑO DEL ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los parámetros determinados en el aceite de argán han sido estudiados como variables estadísticas. Cada valor de las variables corresponde a la media aritmética de tres mediciones independientes de una muestra de aceite  $\pm$  desviación estándar de la media.

En una observación inicial de las variables, se han buscado y discutido los valores anómalos (outliers) para cada uno de los parámetros. También se presenta la correlación entre los distintos parámetros analizados.

Se ha incidido en el estudio de la variabilidad (dispersión) para cada uno de los parámetros y para cada uno de ellos, según el método de extracción (tradicional y semi-industrial) por la importancia de analizar, no sólo si se mantienen límites aceptables para cada parámetro, sino también, si las distintas muestras de aceite se pueden considerar homogéneas. Esto último es fundamental para confiar en el producto final que llega a los consumidores y asegurar la misma calidad a todos ellos.

Ninguno de los parámetros puede considerarse que siga una distribución normal pues los valores de los coeficientes de asimetría y curtosis se encuentran para casi todos ellos, fuera del intervalo (-2, 2) o en caso contrario, el test Chi-cuadrado de normalidad arroja un valor  $p \leq 0,05$ . En consecuencia, y dado que no tenemos un número muy grande de observaciones, se han usado tests no paramétricos (test de Cochran y test de Bartlett) que además nos ofrecen conclusiones sobre variabilidad. El umbral de significación se estableció en  $p < 0,05$ .

La búsqueda de valores anómalos ha revelado que la muestra nº 17 presenta este tipo de datos en cuanto a su perfil de ácidos grasos, tocoferoles y ceras, por lo que se ha decidido excluir del tratamiento estadístico, no obstante en las tablas de resultados de cada parámetro analizado se exponen los datos obtenidos de su correspondiente análisis.

En el estudio *in vivo* de inducción de la colitis y determinación del daño colónico, los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de la media. Se determinan las diferencias significativas utilizando una ANOVA de doble vía con un test *a posteriori* de Fisher. Se consideran significativos los valores de  $p < 0,05$ .

Se ha utilizado el programa estadístico *Statgraphics Plus*, versión 4.1, *Statistical Graphics Corp. Copyright 1994-1999*.





## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



Actualmente el aceite de argán es objeto de diversos estudios enfocados a un mejor conocimiento de su valor nutricional y propiedades saludables, sin olvidar el importante papel económico y medioambiental que este cultivo tiene en su lugar de origen. Sin embargo, de la amplia revisión bibliográfica realizada se deduce por una parte, una gran variabilidad en los datos aportados en estudios sobre parámetros de calidad y por otra, escasez de trabajos publicados en lo que se refiere a su contenido de minerales, elementos traza y componentes con carácter antioxidante, como polifenoles y tocoferoles, así como de capacidad antioxidante total. Todo apunta a la necesidad de mejorar notablemente el proceso de obtención “en pro” de alcanzar un producto con características normalizadas, de forma que las variaciones en su calidad higiénica, sanitaria, sensorial, culinaria, etc., sólo se vean afectadas por factores no controlables.

Partiendo de semillas de argán sanas y aplicando un proceso de extracción del aceite apropiado y controlado, se obtiene un aceite virgen que sin duda, destaca por sus características organolépticas y nutricionales.

En este sentido, supone un avance importante la propuesta en 2002 de la norma de calidad Marroquí (N.M. 08.5.090) que define las especificaciones de calidad de este aceite –denominaciones, criterios de pureza, criterios de calidad, empleo de aditivos, contaminantes, higiene, acondicionamiento, envasado, etiquetado y métodos de análisis– así como su clasificación en dos tipos: aceite de argán apto para consumo humano (virgen extra, virgen fino y virgen corriente) y aceite de argán no apto para el consumo (virgen lampante). Al igual que otras organizaciones relacionadas con la calidad de los aceites vegetales comestibles, como el Consejo Oleícola Internacional (COI) y la Comisión del Codex Alimentarius FAO/WHO, esta normativa incluye límites máximos para numerosos parámetros. La norma resulta en ciertos aspectos, similar al Reglamento (CE) nº 1989/2003 de la Comisión de las Comunidades Europeas, que establece los criterios de calidad y pureza de los aceites de oliva, clasificando los aceites de oliva vírgenes en diferentes categorías en función de parámetros analíticos y organolépticos.

En la presente memoria se ha abordado el estudio de 26 muestras de aceite de argán, que como hemos resaltado anteriormente es un aceite virgen y se ha considerado oportuno clasificarlas en dos grupos en función del método de extracción: tradicional y semi-industrial o parcialmente mecanizado, anteriormente descritos. Los resultados expuestos a continuación han sido analizados en función de ello; además, se contrastan con las especificaciones reglamentarias citadas y con los datos aportados por otros autores.

## 1. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL ACEITE DE ARGÁN

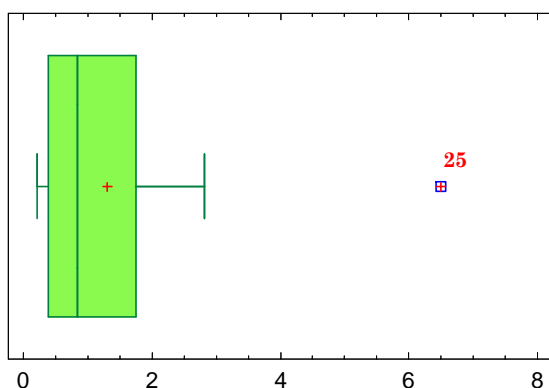
Con objeto de hacer una evaluación de la calidad de las muestras de aceite de argán, se ha determinado el grado de acidez, índice de peróxidos, humedad e impurezas volátiles, impurezas insolubles en éter de petróleo y absorbancia en la región del ultravioleta, resultados que exponemos en la **Tabla 17**. Cada valor corresponde a la media y desviación estándar de la muestra procesada por triplicado.

**Tabla 17.**  
Parámetros de calidad de las muestras de aceite de argán analizadas.

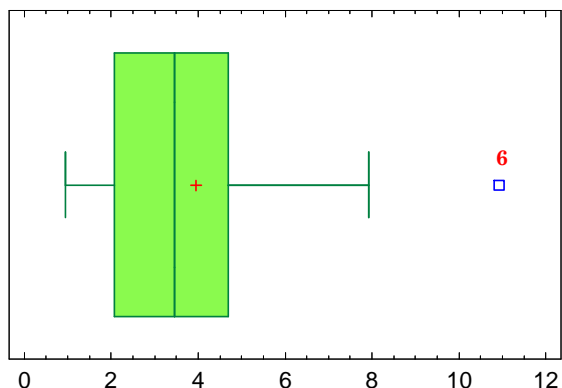
Muestra	Grado de acidez (% m/m ácido oleico)	Índice peróxidos (mEqO <sub>2</sub> /Kg)	K <sub>270</sub>	K <sub>232</sub>	Humedad e impurezas volátiles (%)	Impurezas insolubles en éter de petróleo (%)
1	1,99±0,12	4,08±0,40	0,21±0,01	1,80±0,15	0,03±0,01	0,07±0,01
2	2,05±0,07	3,89±0,35	0,27±0,02	2,05±0,06	0,05±0,01	0,09±0,02
3	1,75±0,01	2,06±0,60	0,60±0,02	3,02±0,08	0,04±0,02	0,12±0,04
4	0,84±0,01	1,23±0,70	0,19±0,01	0,73±0,08	0,03±0,01	0,08±0,01
5	0,26±0,02	1,95±0,50	0,16±0,01	0,68±0,09	0,06±0,02	0,11±0,01
6	1,49±0,01	10,93±0,30	0,30±0,01	1,74±0,12	0,08±0,01	0,15±0,03
7	0,22±0,01	0,95±0,60	0,23±0,02	1,63±0,12	0,03±0,01	0,03±0,01
8	1,73±0,01	1,76±0,23	0,55±0,01	1,90±0,09	0,04±0,01	0,03±0,01
9	0,83±0,02	2,54±0,50	0,36±0,01	1,65±0,08	0,02±0,01	0,02±0,01
10	1,42±0,01	3,38±0,20	0,20±0,01	0,95±0,07	0,08±0,01	0,09±0,01
11	0,53±0,01	6,16±0,25	0,56±0,01	2,09±0,11	0,08±0,01	0,07±0,01
12	0,62±0,01	3,53±0,40	0,25±0,01	1,69±0,12	0,05±0,01	0,94±0,01
13	2,82±0,01	5,92±0,70	0,14±0,01	1,44±0,09	0,12±0,05	0,09±0,01
14	0,21±0,03	3,46±0,60	0,26±0,01	1,40±0,13	0,40±0,53	0,11±0,01
15	1,98±0,01	4,21±0,55	0,24±0,01	1,55±0,07	0,08±0,01	0,14±0,04
16	0,46±0,01	3,11±0,30	0,31±0,01	1,41±0,09	0,05±0,01	0,58±0,05
17	0,12±0,02	5,04±0,40	0,16±0,01	1,17±0,11	0,07±0,01	0,09±0,01
18	0,62±0,01	7,93±0,30	0,28±0,01	1,95±0,15	0,04±0,01	0,06±0,01
19	0,27±0,01	1,40±0,50	0,47±0,01	1,61±0,11	0,07±0,01	0,63±0,01
20	0,27±0,01	2,11±0,40	0,28±0,01	1,38±0,09	0,07±0,01	0,49±0,05
21	0,26±0,01	7,23±0,60	0,22±0,01	1,53±0,10	0,03±0,01	0,07±0,01
22	0,87±0,02	2,74±0,50	0,28±0,01	1,49±0,12	0,06±0,01	0,05±0,01
23	1,30±0,01	7,75±0,30	0,25±0,01	1,52±0,13	0,07±0,01	0,04±0,01
24	2,78±0,01	3,87±0,20	1,02±0,01	2,18±0,13	0,12±0,03	0,09±0,01
25	6,49±0,01	1,81±0,30	0,20±0,01	1,21±0,08	0,09±0,01	0,08±0,01
26	0,39±0,02	4,70±0,60	0,23±0,01	1,34±0,09	0,12±0,06	0,79±0,02

Con respecto a los parámetros de calidad estudiados, podemos destacar que del total de muestras analizadas (n=26), algunos parámetros presentan una gran dispersión. Los parámetros con mayor variabilidad son grado de acidez, humedad e impurezas volátiles, impurezas insolubles en éter de petróleo y coeficiente de extinción al ultravioleta K<sub>270</sub>. De hecho, se han detectado algunos valores atípicos (*outliers*) en el gráfico de Caja y Bigotes (*Box and Whisker plot*) para todos ellos. Hemos dado especial importancia al hecho de que

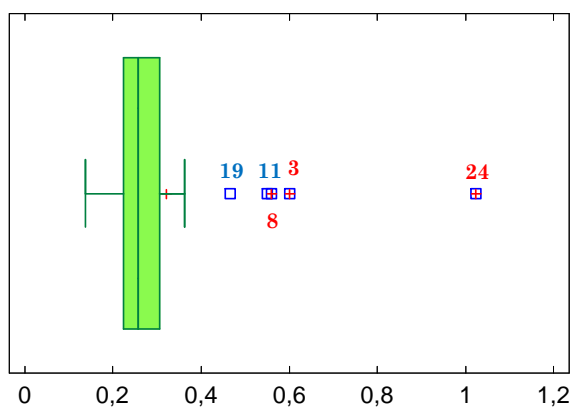
un alto número de muestras (3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 14, 19, 20, 24, 25 y 26) son outliers para diversos parámetros, como puede observarse en las Figuras 45 – 50. Destacar que la mayoría de estas muestras han sido obtenidas mediante el método de extracción tradicional, evidenciando así la mejora alcanzada en la calidad de los aceites obtenidos por el método de extracción semi-industrial.



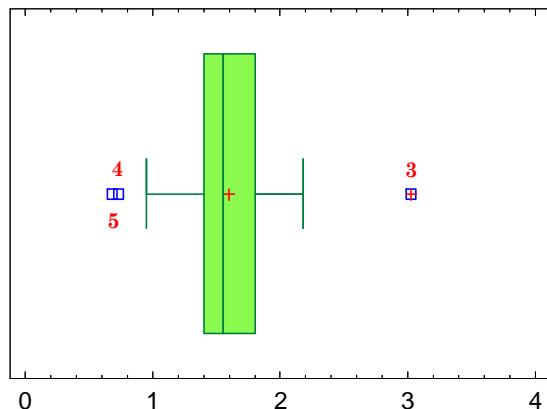
**Figura 45.** Grado acidez (% m/m ácido oleico) en el total de muestras analizadas.



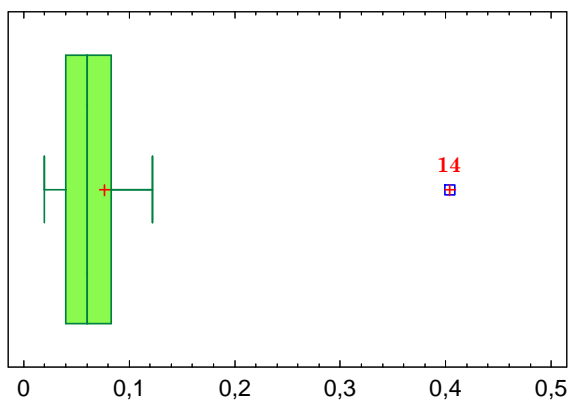
**Figura 46.** Índice de peróxidos (meq O<sub>2</sub>/Kg) en el total de muestras analizadas.



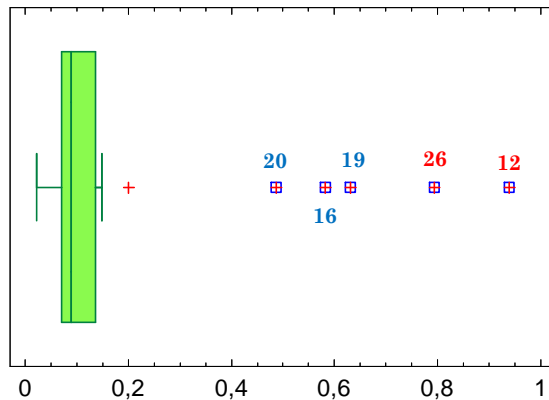
**Figura 47.** Valores de extinción específica a 270 nm en el total de muestras analizadas.



**Figura 48.** Valores de extinción específica a 232 nm en el total de muestras analizadas.



**Figura 49.** Humedad e impurezas volátiles (% m/m) en el total de muestras analizadas.



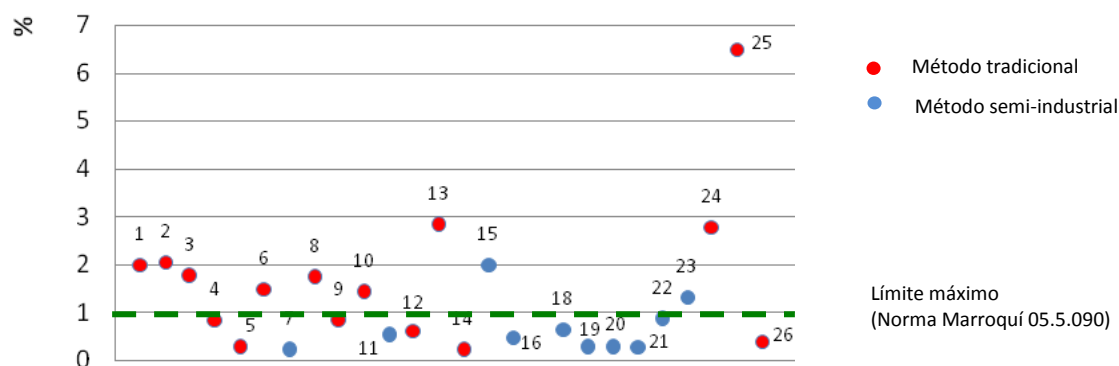
**Figura 50.** Impurezas insolubles en éter de petróleo (% m/m) en el total de muestras analizadas.

En la **Tabla 18**, se exponen los límites máximos establecidos para los criterios de calidad del aceite de argán virgen según la norma Marroquí 08.5.090.

<b>Tabla 18.</b> Límites máximos establecidos para los criterios de calidad y contaminantes del aceite de argán según la Norma Marroquí 08.5.090.				
<b>CRITERIOS DE CALIDAD</b>				
	Aceite de argán virgen extra	Aceite de argán virgen fino	Aceite de argán virgen corriente	Aceite de argán virgen lampante
Grado de acidez (% m/m) expresado en ácido oleico	≤ 1,0	≤ 2,0	≤ 3,3	> 3,3
Índice de peróxidos en meq O <sub>2</sub> activo por Kg de aceite	≤ 20	≤ 20	≤ 20	Sin límite
- 270 nm	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,30	Sin límite
- ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,01	Sin límite
<b>CRITERIOS ORGANOLÉPTICOS</b>				
Color	Característico del producto designado.			
Olor y sabor	Exento de olor, sabor extraño o rancidez.			
<b>CONTAMINANTES</b>				
Humedad y materias volátiles (% m/m)	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3
Impurezas insolubles en éter de petróleo (% m/m)	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,4

### 1.1. Grado de acidez

En cuanto al grado de acidez (% m/m ácido oleico), en las muestras obtenidas por el método de extracción tradicional, los valores fluctúan entre 0,21-6,49%, con un coeficiente de variación (CV) de 91,55%. En las muestras elaboradas mediante método semi-industrial, los valores oscilan entre 0,22-1,98%, con un CV del 83,86%, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos para un nivel de confianza del 95% ( $p=0,002$  en test de Cochran y  $p=0,004$  en test de Bartlett).



**Figura 51.** Valores del grado de acidez (% m/m expresado en ácido oleico) en las muestras analizadas.

Un total de 9 muestras de aceite obtenidas mediante método de extracción tradicional y 2 muestras de aceite obtenidas mediante método semi-industrial exceden el límite de 1,0 (% m/m, expresado como ácido oleico), establecido en la Normativa Marroquí para el aceite de argán virgen extra, correspondiendo 7 muestras a aceite virgen fino, 3 muestras a aceite virgen corriente y 1 muestra a aceite virgen lampante.

Hilali *et al.* (2005) obtienen valores de acidez en aceites de argán que oscilan entre 0,1% y 1,4%, inferiores a los obtenidos en nuestro estudio. El método de elaboración, condiciones higiénicas, almacenamiento de las semillas así como el proceso de tostado, pueden influir en los valores de acidez (Hilali *et al.* 2005). Según estos autores, los valores de acidez del aceite de argán virgen preparado con semillas tostadas son inferiores que en aceites obtenidos a partir de semillas sin tostar. En nuestro estudio, las muestras número 13 y 25, elaboradas con semillas sin tostar y mediante el método tradicional muestran los valores más elevados.

En trabajos anteriores, Berrada (1972) y Charrouf (1984), determinan el valor medio de acidez en aceite de argán obtenido mediante el método tradicional, el primero, y mediante método semi-industrial, el segundo, siendo sus resultados de 1,3% y de 1,0% (expresados como ácido oleico), respectivamente.

## 1.2. Índice de peróxidos

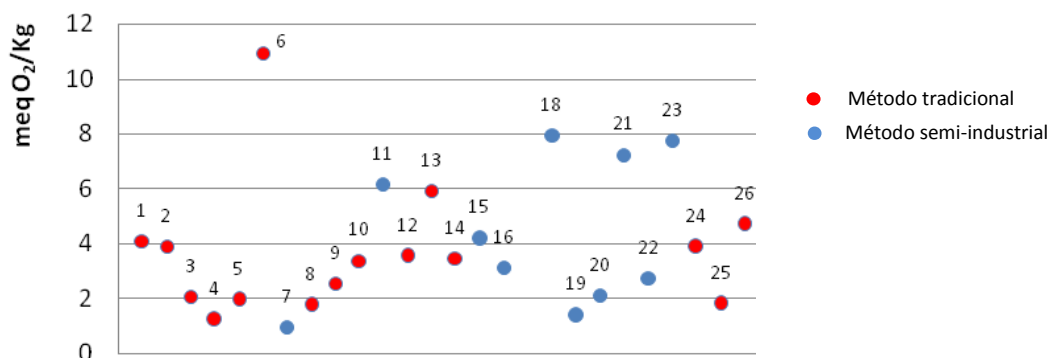
Los parámetros químicos clásicos usados para determinar el grado de oxidación en los aceites vegetales comestibles son el índice de peróxidos y los valores de extinción al ultravioleta,  $K_{270}$  y  $K_{232}$ .

En las muestras analizadas, el índice de peróxidos oscila entre 1,23-10,93 meq  $O_2$ /Kg en los aceites obtenidos mediante el método de extracción tradicional y entre 0,95-7,93 meq  $O_2$ /Kg en los obtenidos mediante el método semi-industrial. Todas las muestras presentan un valor de índice de peróxidos inferior al límite máximo establecido de 20 meq  $O_2$ /Kg para el aceite de argán virgen extra en la Normativa Marroquí (**Figura 52**). El CV obtenido en las muestras de aceite elaboradas por el método tradicional ha sido de 64,71% y en las muestras elaboradas mediante el método semi-industrial de 61,83%, lo que puede ser indicativo de la alta variabilidad en las condiciones de obtención y conservación de este aceite.

Los valores más elevados que se observan para algunas muestras elaboradas mediante el método tradicional (muestras 6, 13 y 26) probablemente son consecuencia del resultado de condiciones insatisfactorias de obtención y conservación de los aceites. De la misma manera, podemos observar que algunas muestras elaboradas mediante el método semi-industrial presentan también valores elevados (11, 18, 21 y 23) que



presumiblemente, pueden atribuirse a las condiciones de almacenamiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos para un nivel de confianza del 95% ( $p=0,678$  en test de Cochran y  $p=0,682$  en test de Bartlett).



**Figura 52.** Valores de índice de peróxidos (meq O<sub>2</sub>/Kg) en las muestras analizadas.

Algunos componentes del aceite de argán son muy sensibles a la oxidación; no obstante, según diversos autores, el aceite de argán presenta mayor estabilidad que el aceite de oliva virgen, que atribuyen a la presencia de tocoferoles y polifenoles (Charrouf y Guillaume, 1999; Khallouki *et al.* 2003). Khallouki (2003) estudia la estabilidad térmica del aceite de argán obtenido por los dos métodos de extracción descritos, en comparación con el aceite de girasol. Evalúa la rancidez, mediante la generación de peróxidos, observando una mayor estabilidad del aceite de argán.

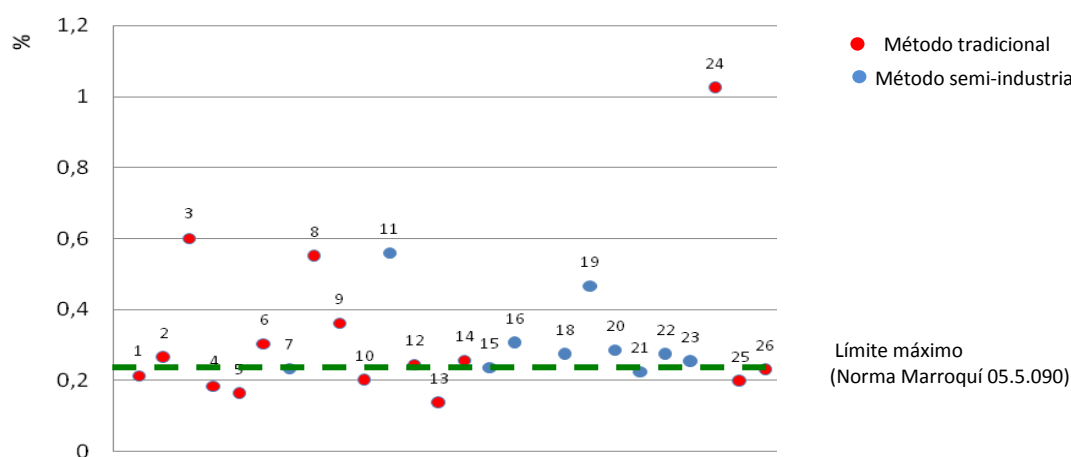
Hilali *et al.* (2005) obtienen en aceite de argán valores de índice de peróxidos ligeramente inferiores (0,25–5,70 meq O<sub>2</sub>/Kg) a los encontrados en nuestro estudio.

### 1.3. Coeficientes de extinción al ultravioleta (K<sub>270</sub> y K<sub>232</sub>)

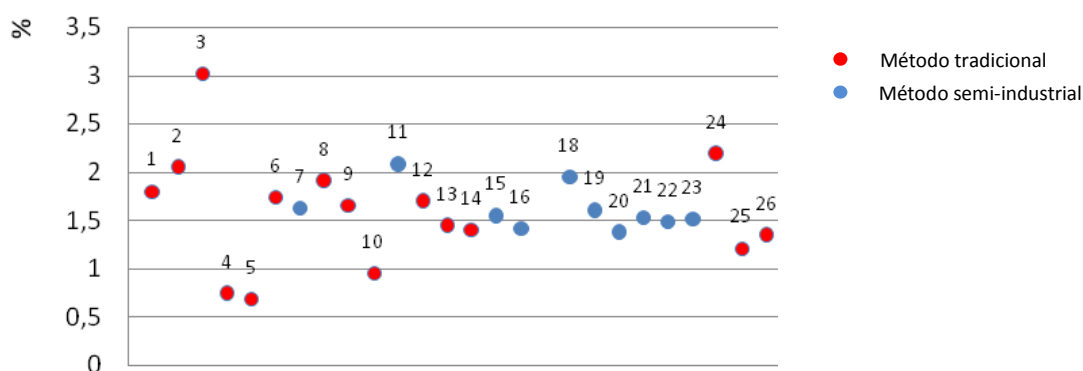
Para el método de extracción tradicional, los coeficientes de extinción al ultravioleta, K<sub>270</sub> y K<sub>232</sub>, oscilan entre 0,14-1,02 y entre 0,68-3,02, respectivamente. Un total de 7 muestras exceden el límite máximo establecido para el aceite de argán virgen extra (K<sub>270</sub> ≤ 0,25) de acuerdo a la Normativa Marroquí, correspondiendo 5 muestras a aceite virgen lampante. En el método semi-industrial, K<sub>270</sub> y K<sub>232</sub> oscilan entre 0,22-0,56 y entre 1,38-2,09, respectivamente. Un total de 7 muestras exceden el límite máximo establecido en la Normativa Marroquí para el coeficiente K<sub>270</sub>, siendo 3 de ellas aceite de argán virgen lampante.

El CV obtenido para el coeficiente de extinción K<sub>232</sub> ha sido de 37,72% en el método tradicional y de 14,19% en el método semi-industrial; en el método tradicional, se ha

obtenido un CV para el coeficiente de extinción  $K_{270}$  de 71,06% y en el método semi-industrial de 35,81%, lo que también indica una alta variabilidad en los resultados obtenidos. La variabilidad de ambos parámetros ( $K_{270}$  y  $K_{232}$ ) presenta diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% dependiendo del método de extracción del aceite; si realizamos un estudio de la varianza, obtenemos que  $p=0,003$  para el test de Cochran y  $p=0,006$  para el test de Bartlett.



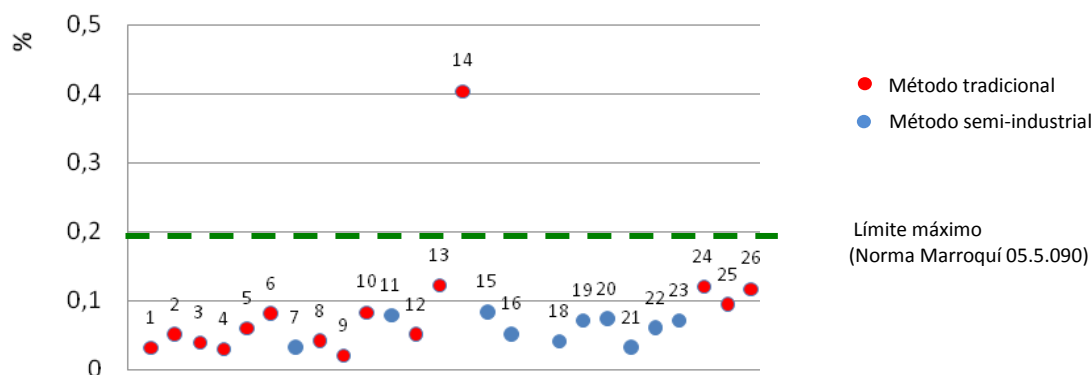
**Figura 53.** Valores de extinción específica a 270 nm en las muestras de aceite analizadas.



**Figura 54.** Valores de extinción específica a 232 nm en las muestras de aceite analizadas.

#### 1.4. Humedad e impurezas volátiles

En relación a humedad e impurezas volátiles, solamente 1 muestra del total analizado, obtenida por el método de extracción tradicional, excede el límite máximo de 0,2% establecido para el aceite de argán virgen extra de acuerdo a la Normativa Marroquí. La variabilidad de este parámetro es de nuevo más baja en las muestras obtenidas mediante el método de extracción semi-industrial (CV=30,65%) que en las muestras obtenidas por el método tradicional (CV=104,70%), detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p<0,0001$  para el test de Cochran y  $p<0,0001$  para el test de Bartlett).

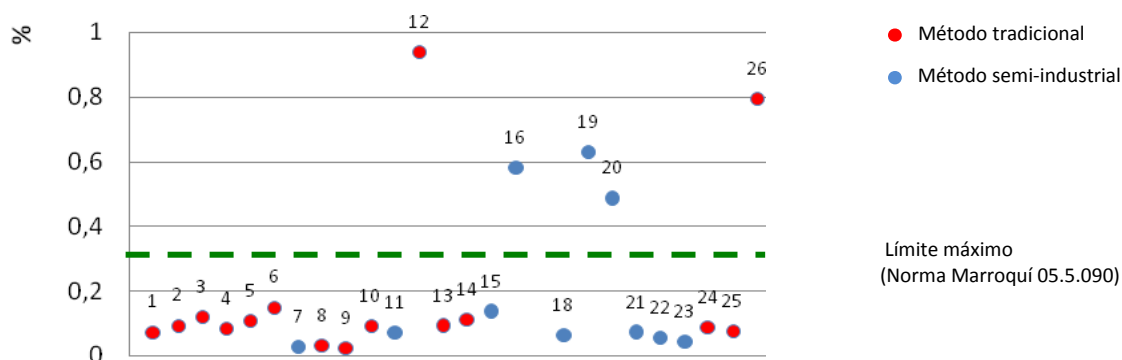


**Figura 55.** Valores de humedad e impurezas volátiles (%) en las muestras analizadas.

### 1.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo

Para las impurezas insolubles en éter de petróleo, 2 muestras (método tradicional) y 3 muestras (método semi-industrial) exceden el límite máximo de 0,3% (m/m) establecido para el aceite de argán virgen extra en la Normativa Marroquí, correspondiendo todas ellas a aceite de argán virgen lampante. En las muestras obtenidas mediante método tradicional, los datos oscilan entre un valor mínimo de 0,02% (m/m) y un máximo de 0,94% (m/m); el CV ha sido del 144,97%. Por otra parte, las muestras obtenidas mediante método semi-industrial, presentan un mínimo de 0,03% (m/m) y un máximo de 0,63% (m/m), con un CV de 113,55%.

Del análisis estadístico de estos datos podemos decir que existe una variabilidad muy alta entre los resultados obtenidos y que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de extracción del aceite para un nivel de confianza del 95% ( $p=0,689$  para el test de Cochran y  $p=0,699$  para el test de Barlett).



**Figura 56.** Impurezas insolubles en éter de petróleo (%) en las muestras analizadas.

A fin de contrastar el nivel de calidad del aceite de argán con el de los aceites de oliva vírgenes, en los que los límites reglamentados en cuanto a criterios de calidad son bastante rigurosos, en la **Tabla 19** se comparan las medias y rangos obtenidos en las muestras de aceite de argán analizadas con los límites máximos establecidos en la legislación vigente en la U.E. para los aceites de oliva virgen y virgen extra.

**Tabla 19.**  
Datos comparativos entre las muestras de aceite de argán virgen analizadas y límites máximos establecidos para aceite de oliva virgen extra y virgen.

Parámetros	Aceite de argán (n=25)		Aceite de oliva virgen (Límites máximos U.E.) <sup>a</sup>	
	Media	Rango	Virgen extra	Virgen
Grado acidez (% m/m ácido oleico)	1,30	0,21 – 6,49	≤ 0,8	≤ 2,0
Índice de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg aceite)	3,95	0,95 – 10,93	≤ 20	≤ 20
Humedad e impurezas volátiles (% m/m)	0,08	0,02 – 0,40	≤ 0,2	≤ 0,2
Impurezas insolubles en éter de petróleo (%m/m)	0,20	0,02 – 0,94	≤ 0,1	≤ 0,1
K <sub>270</sub>	0,32	0,14 - 1,02	≤ 0,22	≤ 0,25
K <sub>232</sub>	1,60	0,68 - 3,02	≤ 2,50	≤ 2,60

<sup>a</sup>Reglamento (CEE) n<sup>o</sup> 2568/1991 de la Comisión, DO L 248 de 5.9.1991. Modificaciones Reglamento (CE) n<sup>o</sup> 796/2002 de la Comisión y Reglamento (CE) n<sup>o</sup> 1989/2003 de la Comisión).

Como se puede observar, los resultados obtenidos superan en determinados parámetros como son el grado de acidez (14 muestras), humedad e impurezas volátiles (1 muestra), impurezas insolubles en éter de petróleo (10 muestras), K<sub>270</sub> (19 muestras) y K<sub>232</sub> (1 muestra), los límites máximos establecidos para el aceite de oliva virgen extra, siendo menos las que exceden los límites máximos establecidos para el aceite de oliva virgen (4 muestras en cuanto al grado de acidez y 14 muestras para K<sub>270</sub>).

Por último, se han determinado las posibles correlaciones entre los parámetros de calidad estudiados en las muestras de aceite de argán, encontrando solamente correlación directa estadísticamente significativa entre los valores de los coeficientes de extinción, K<sub>232</sub> y K<sub>270</sub> ( $r=0,641$ ;  $p<0,001$ ).

## 2. MINERALES Y ELEMENTOS TRAZA

Aunque normalmente, la determinación de minerales y elementos traza no se incluye entre las determinaciones básicas de calidad de los aceites vegetales comestibles, consideramos absolutamente necesario comprobar la presencia de elementos tales como Cu, Fe, Cr, Mn, que al margen de sus propiedades nutricionales, pueden ejercer un papel negativo sobre la estabilidad del aceite, ya que actúan como catalizadores del proceso de oxidación, afectando al valor biológico y por supuesto, a las características sensoriales del producto. Hierro y Cu son particularmente perjudiciales, puesto que pueden acelerar de forma notable las reacciones de oxidación a concentraciones muy bajas, apareciendo involucrados en el proceso de rancidez (Salcedo, 1991; Cheftel y Cheftel, 1992). Asimismo, en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, hemos comprobado que la presencia de Pb puede ser elevada en algunas muestras de aceite de oliva debido a residuos de plaguicidas, fertilizantes, contaminación medioambiental, etc. Los efectos toxicológicos de este elemento, tan ubicuo y con elevada persistencia biológica aún a bajas concentraciones, son bien conocidos (Cabrera *et al.* 1995a; 1995b; Roca *et al.* 2001).

La determinación de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb en aceites vegetales comestibles, exige el empleo de técnicas analíticas de elevada sensibilidad, exactitud y precisión. Si además, se pretende que resulten útiles en análisis de rutina, deben ser versátiles y aportar una buena relación aplicabilidad/coste instrumental. La espectroscopía de absorción atómica en especial, en su modalidad de atomización electrotérmica, cumple estas premisas y aparece como una de las técnicas más adecuadas. La optimización de las condiciones analíticas para la cuantificación de cada elemento, constituye el punto de partida fundamental, para conseguir los objetivos marcados.

Un factor fundamental cuando se propone un método analítico, es la fuerte relación entre el tratamiento de la muestra y el proceso de cuantificación final del elemento a analizar, por lo que es importante contar con los medios apropiados para transformar la muestra en una disolución conveniente para su análisis. Es necesario evitar cualquier pérdida del elemento y/o contaminaciones adicionales, siendo especialmente complicado cuando se requiere un tratamiento previo de la muestra para destruir la matriz orgánica, ya que la mineralización es sin duda, la etapa más larga y tediosa del análisis y en la que se pueden cometer más errores, como pueden ser pérdidas de analito por volatilización, contaminación de muestras y blancos, con el consiguiente error e imprecisión de los resultados analíticos y aumento de los límites de detección. Estos problemas se ven acentuados en la determinación a nivel de trazas, dada la facilidad de contaminación de la muestra durante todas las etapas del análisis. En nuestro estudio, el objetivo primordial ha sido obtener un procedimiento válido para la cuantificación de estos

metales de forma directa en la misma solución analítica, sin tratamiento previo de la muestra, a fin de simplificar al máximo, el tratamiento y que resulte aplicable en análisis de rutina para el control de calidad del aceite de argán. Aunque son diversos los disolventes orgánicos utilizados, según la mayoría de los autores consultados y la amplia experiencia de nuestro grupo de investigación, la metilisobutilcetona (MIBK) es el disolvente que proporciona los mejores resultados (Lendínez, 2004).

El método analítico utilizado en el presente trabajo resulta muy adecuado para la determinación de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb en las muestras de aceite analizadas, teniendo en cuenta los niveles de los mismos. Asimismo, su aplicación puede hacerse extensiva al análisis de otros aceites vegetales comestibles. La exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad del método ha quedado demostrada en el proceso de validación (resultados incluidos en **Tablas 7-11**). Una vez optimizadas las condiciones de medida (**Tablas 7-11**), se ha procedido a cuantificar la presencia de estos elementos en las muestras estudiadas. Los resultados se muestran en la **Tabla 20**. Cada valor corresponde a la media y desviación estándar de la muestra procesada por triplicado.

**Tabla 20.**  
Concentraciones de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb en las muestras de aceite de argán analizadas.

Muestra	Cobre ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Hierro ( $\text{mg/Kg}$ )	Cromo ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Manganeso ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Plomo ( $\mu\text{g/Kg}$ )
1	190,57 $\pm$ 2,00	0,89 $\pm$ 0,08	12,70 $\pm$ 0,04	30,15 $\pm$ 0,03	28,50 $\pm$ 0,17
2	292,45 $\pm$ 3,00	0,90 $\pm$ 0,08	28,00 $\pm$ 0,07	40,15 $\pm$ 0,05	30,23 $\pm$ 0,16
3	513,55 $\pm$ 2,50	3,06 $\pm$ 0,98	31,10 $\pm$ 0,09	48,40 $\pm$ 0,09	106,30 $\pm$ 0,25
4	185,00 $\pm$ 1,50	0,78 $\pm$ 0,05	25,70 $\pm$ 0,08	25,00 $\pm$ 0,04	52,82 $\pm$ 0,50
5	175,70 $\pm$ 2,00	0,75 $\pm$ 0,02	12,00 $\pm$ 0,03	26,00 $\pm$ 0,03	107,50 $\pm$ 2,00
6	410,40 $\pm$ 3,20	2,47 $\pm$ 0,70	31,10 $\pm$ 0,09	38,45 $\pm$ 0,09	305,00 $\pm$ 2,15
7	165,40 $\pm$ 0,60	0,95 $\pm$ 0,07	11,50 $\pm$ 0,04	18,30 $\pm$ 0,02	35,60 $\pm$ 0,15
8	170,50 $\pm$ 0,80	0,99 $\pm$ 0,09	10,30 $\pm$ 0,03	25,20 $\pm$ 0,04	45,50 $\pm$ 0,25
9	290,80 $\pm$ 2,40	1,88 $\pm$ 0,08	15,10 $\pm$ 0,06	38,00 $\pm$ 0,05	90,80 $\pm$ 0,50
10	300,05 $\pm$ 2,80	2,75 $\pm$ 0,09	12,00 $\pm$ 0,04	45,00 $\pm$ 0,07	105,20 $\pm$ 0,20
11	160,00 $\pm$ 0,50	0,75 $\pm$ 0,05	17,38 $\pm$ 0,06	20,28 $\pm$ 0,04	80,10 $\pm$ 0,10
12	160,40 $\pm$ 0,40	0,88 $\pm$ 0,07	15,60 $\pm$ 0,04	21,00 $\pm$ 0,02	29,00 $\pm$ 0,10
13	180,20 $\pm$ 0,60	0,75 $\pm$ 0,02	10,80 $\pm$ 0,04	18,10 $\pm$ 0,03	52,00 $\pm$ 0,15
14	280,50 $\pm$ 0,80	0,93 $\pm$ 0,06	35,00 $\pm$ 0,09	55,30 $\pm$ 0,10	30,75 $\pm$ 0,20
15	170,60 $\pm$ 0,75	0,90 $\pm$ 0,07	32,00 $\pm$ 0,12	42,70 $\pm$ 0,12	32,00 $\pm$ 0,25
16	385,00 $\pm$ 0,90	1,50 $\pm$ 0,10	48,10 $\pm$ 0,10	68,50 $\pm$ 0,10	80,40 $\pm$ 0,35
17	176,75 $\pm$ 0,35	0,75 $\pm$ 0,02	25,18 $\pm$ 0,08	35,00 $\pm$ 0,11	100,00 $\pm$ 0,26
18	282,60 $\pm$ 0,70	0,89 $\pm$ 0,06	31,10 $\pm$ 0,09	48,50 $\pm$ 0,10	40,00 $\pm$ 0,25
19	158,35 $\pm$ 0,45	1,70 $\pm$ 0,09	12,10 $\pm$ 0,05	15,00 $\pm$ 0,06	90,10 $\pm$ 0,30
20	290,70 $\pm$ 0,60	0,90 $\pm$ 0,06	13,00 $\pm$ 0,04	25,50 $\pm$ 0,05	45,60 $\pm$ 0,30
21	167,40 $\pm$ 0,40	0,85 $\pm$ 0,05	12,60 $\pm$ 0,03	20,20 $\pm$ 0,03	95,70 $\pm$ 0,35
22	280,00 $\pm$ 0,36	0,92 $\pm$ 0,06	10,00 $\pm$ 0,02	21,10 $\pm$ 0,04	48,60 $\pm$ 0,25
23	278,60 $\pm$ 0,70	0,87 $\pm$ 0,04	13,10 $\pm$ 0,04	15,50 $\pm$ 0,02	52,82 $\pm$ 0,50
24	695,70 $\pm$ 0,95	4,05 $\pm$ 0,10	55,30 $\pm$ 0,16	70,75 $\pm$ 0,25	450,00 $\pm$ 2,00
25	180,50 $\pm$ 0,40	0,75 $\pm$ 0,03	38,10 $\pm$ 0,11	40,30 $\pm$ 0,10	38,20 $\pm$ 0,16
26	190,00 $\pm$ 0,55	0,88 $\pm$ 0,06	22,00 $\pm$ 0,07	20,30 $\pm$ 0,08	28,50 $\pm$ 0,10

La Norma Marroquí establece límites máximos para determinados elementos metálicos como son el hierro, cobre, plomo y arsénico, que se exponen en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.**  
Límites máximos establecidos para hierro, cobre y plomo en el aceite de argán según la Norma Marroquí 08.5.090.

	Aceite de argán virgen extra	Aceite de argán virgen fino	Aceite de argán virgen corriente	Aceite de argán virgen lampante
Trazas metálicas (mg/Kg)				
Hierro	≤ 3,0	≤ 3,0	≤ 3,0	≤ 3,0
Cobre	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1
Plomo	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1
Arsénico	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1

La Reglamentación técnico-sanitaria española contempla también estos cuatro elementos (hierro, cobre, plomo y arsénico). Así, en el R.D. 308/1983 de la Presidencia del Gobierno, se permiten las siguientes cantidades máximas:

Hierro	Cobre	Plomo	Arsénico
10 ppm	0,4 ppm	0,1 ppm	0,1 ppm

Se observa quizás por ser una normativa bastante anterior, como los valores admitidos de Fe y Cu son mucho más elevados. Sin embargo, la Norma Comercial aplicable al aceite de oliva y al aceite de orujo de oliva, aprobada por el Consejo Oleícola Internacional COI/T.15/NC nº 3/Rev 2, del 24 de noviembre de 2006, es más restrictiva en cuanto a los límites máximos para algunos metales y establece para el aceite de oliva virgen extra y aceite de oliva virgen los siguientes:

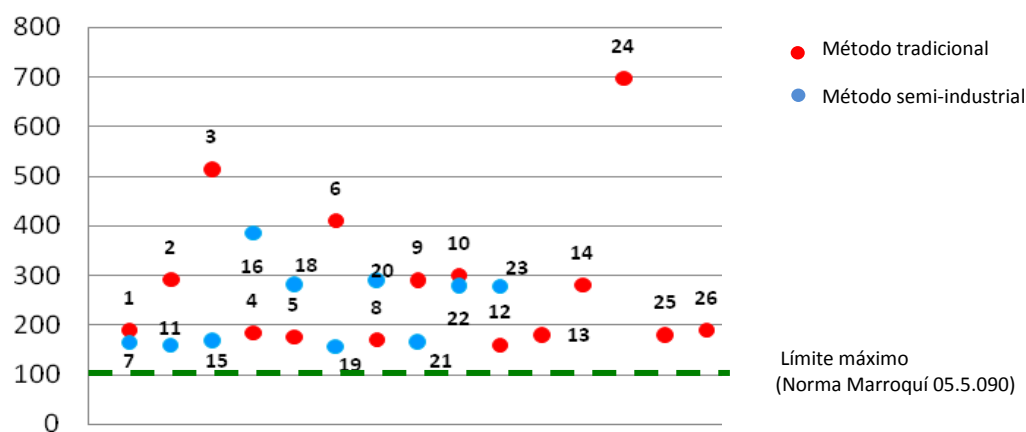
Hierro	Cobre
≤ 3,0 ppm	≤ 0,1 ppm

Estos valores concuerdan con los establecidos en la Norma Marroquí sobre aceite de argán, anteriormente citada.

## 2.1. Cobre

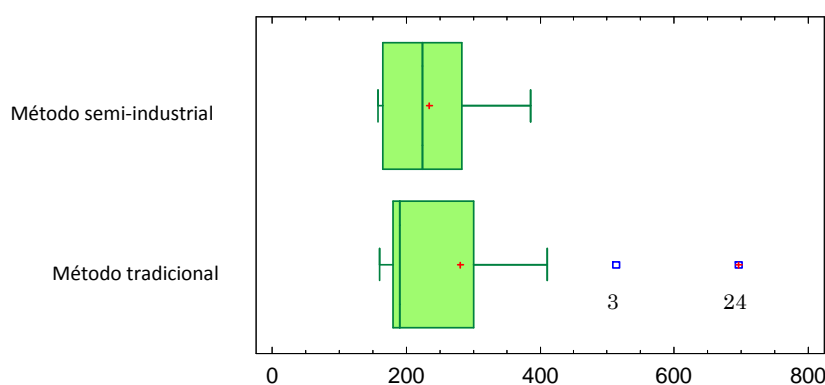
Los niveles medios de cobre en los aceites de argán, oscilan en las muestras obtenidas mediante el método de extracción tradicional, entre 160,40-695,70 µg/Kg y para las muestras obtenidas por el método semi-industrial, entre 158,35-385,00 µg/Kg, excediendo todos los valores el límite máximo de 0,1 mg/Kg establecido para el aceite de argán en la Norma Marroquí y para el aceite de oliva virgen por el C.O.I. Los valores más altos corresponden a muestras obtenidas mediante método tradicional y los valores

más bajos corresponden a las muestras nº 19 ( $158,35 \pm 0,45 \mu\text{g/Kg}$ ) y nº 11 ( $160,00 \pm 0,50 \mu\text{g/Kg}$ ), ambas elaboradas mediante el método semi-industrial. En la **Figura 57** se representan gráficamente los valores obtenidos tras la determinación de cobre en las muestras de aceite de argán analizadas.



**Figura 57.** Niveles de Cu ( $\mu\text{g/Kg}$ ) en las muestras de aceite de argán analizadas.

Como puede observarse en la **Figura 58**, para un nivel de confianza del 95%, existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de elaboración ( $p=0,036$  para el test de Cochran y  $p=0,050$  para el test de Bartlett). La variabilidad del cobre es menor en las muestras obtenidas mediante el método de extracción semi-industrial, con un CV de 33,98%, que en las muestras obtenidas por el método tradicional, CV=54,39%.



**Figura 58.** Estudio comparativo de los niveles de cobre ( $\mu\text{g/Kg}$ ) entre los dos métodos de extracción del aceite de argán.

En cuanto a datos recogidos en bibliografía sobre la presencia de metales en aceites vegetales comestibles, podemos citar que el contenido de cobre en distintos tipos de aceite de oliva producidos en España, analizados por Roca (1997), fue de  $48,18 \mu\text{g/Kg}$ , en aceite de oliva virgen;  $45,16 \mu\text{g/Kg}$ , en aceite de oliva y  $47,40 \mu\text{g/Kg}$ , en aceite de orujo de



oliva; por tanto, valores inferiores a los detectados en las muestras de aceite de argán analizadas. Otros datos sobre la presencia de Cu en aceites vegetales comestibles, aparecen en la **Tabla 22**. Estas referencias demuestran claramente la amplia variabilidad en la presencia de este metal en los aceites vegetales comestibles.

<b>Tabla 22.</b>			
<b>Presencia de Cu en aceites vegetales comestibles según diversos estudios.</b>			
<b>Tipo de aceite</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Cu (µg/Kg)</b>	<b>Referencia</b>
Oliva virgen	España	69-29	Viladrich <i>et al.</i> 1986
Oliva virgen	Italia	2,1-209,0	Di Battista <i>et al.</i> 1993
Oliva virgen	España	73-86	Martín-Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva	U.S.A.	740	Shils <i>et al.</i> 1994
Oliva virgen	Bajo Aragón	0,14-0,28	Castillo <i>et al.</i> 1999
Oliva virgen extra	Italia	4±0,3	De Leonardis <i>et al.</i> 2000b
Oliva refinado	Italia	15	De Leonardis y Macciola, 2002
Oliva	Italia	5,1-14,6	Lo Coco <i>et al.</i> 2000
Oliva virgen	España	1,80-18,39	Lendínez, 2004
Girasol	Croacia	< 4	Cindric <i>et al.</i> 2007
Sésamo	Croacia	510-590	Cindric <i>et al.</i> 2007
Avellana	Croacia	48-540	Cindric <i>et al.</i> 2007
Soja	Croacia	< 4	Cindric <i>et al.</i> 2007
Oliva	Croacia	40	Cindric <i>et al.</i> 2007

La presencia de cobre en el aceite de argán podría deberse a diversos factores como la composición del suelo donde crece el árbol, empleo de fertilizantes y posibles contaminaciones durante el proceso de obtención y envasado del aceite.

El cobre, en presencia de oxígeno, actúa en los aceites como prooxidante en la oxidación catalítica de los hidroperóxidos, originando cetonas y aldehídos que alteran sus características organolépticas y generando nuevos radicales que continúan el proceso de oxidación (Pinto *et al.* 2006). Diversos estudios señalan que el poder catalítico del Cu es superior al del Fe (Viladrich *et al.* 1986). Romano *et al.* (2007) estiman que el efecto catalítico del Cu(II) resulta mayor que el del Fe(III) en un estudio sobre la cinética de oxidación del aceite de soja. Wong *et al.* (1980) demuestran la capacidad autooxidativa del cobre a niveles inferiores a 30 ppb mientras que, Botta (1990) apunta que concentraciones de cobre entre 0,5-1 ppm pueden ejercer un gran efecto catalítico.

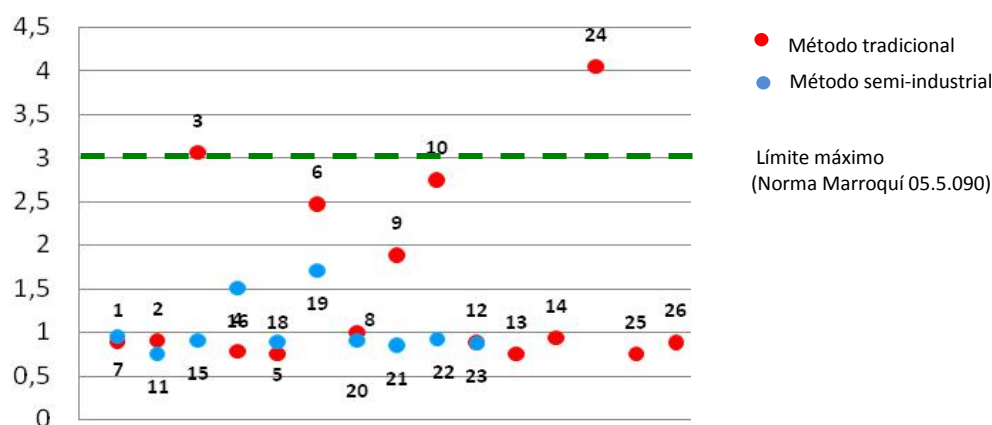
Bendini *et al.* (2006) indican que los metales tanto de origen exógeno (fertilizantes, plaguicidas, contacto con superficies metálicas durante el proceso de extracción) como endógeno (metabolismo de la propia planta), pueden disolverse en el aceite como sales de ácidos grasos. Hierro y cobre pueden catalizar la descomposición de hidroperóxidos en función de su potencial redox, produciendo radicales peroxi y alcoxi que actúan como promotores de la cadena de radicales libres en el proceso oxidativo. Estos autores estudian además, la influencia que tiene la presencia de Cu sobre el contenido en

tocoferoles; concluyen que cuando se añade Cu al aceite, disminuye la cantidad de tocoferoles totales y particularmente, de  $\alpha$ -tocoferol.

Roca (1997) observa que elevadas concentraciones de Cu están relacionadas con un aumento del grado de acidez del aceite. En nuestro estudio no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre los niveles de cobre y el grado de acidez de las muestras de aceite ( $r=0,137$ ;  $p=0,513$ ).

## 2.2. Hierro

Las concentraciones de hierro oscilan para el método tradicional entre 0,75-4,05 mg/Kg, y para el método semi-industrial entre 0,75-1,70 mg/Kg, observándose que tan sólo las muestras n° 3 (3,06 mg/Kg) y n° 24 (4,05 mg/Kg), ambas obtenidas mediante el método tradicional, superan el límite máximo establecido por la Normativa Marroquí y por el COI (2006) de 3,0 mg/Kg. La mayor parte de las muestras aportan concentraciones inferiores a 2 mg/Kg. Los niveles de hierro obtenidos tras el análisis de las muestras de aceite de argán se representan gráficamente en la **Figura 59**.

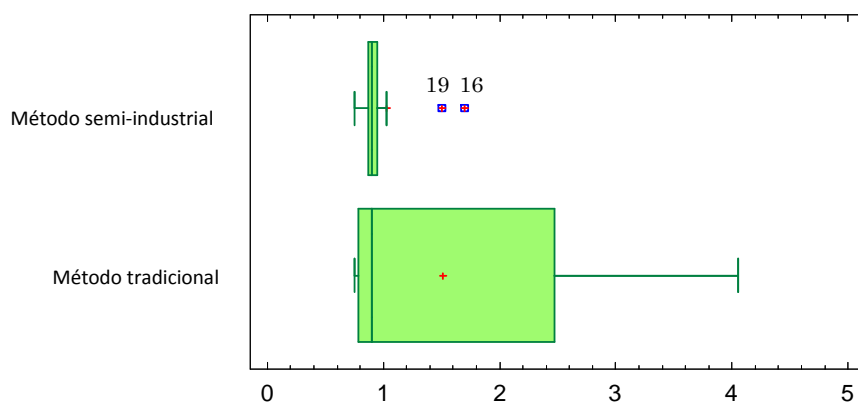


**Figura 59.** Niveles de Fe (mg/Kg) en las muestras de aceite de argán analizadas.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos procesos de extracción del aceite a un nivel de confianza del 95% ( $p<0,001$  para test de Cochran y  $p<0,001$  para el test de Bartlett). La variabilidad del hierro es más baja en las muestras obtenidas mediante el método semi-industrial (CV=30,53%) que en las obtenidas mediante el método tradicional (CV=70,33%) (**Figura 60**).

Las diferencias en las concentraciones del metal en el aceite pueden ser debidas en gran medida, al tipo de suelo de cultivo, sobre todo en relación a la concentración total del elemento en el suelo y al pH del mismo. La abundancia y extensión de los

compuestos de hierro en la naturaleza, justifica la presencia constante de este elemento en todos los productos vegetales y animales. El proceso de extracción y de envasado, maquinaria, conducciones, depósitos u otros objetos que se usan sobre todo en el método de extracción artesanal, pueden ceder este metal al aceite (Fennema, 2000).



**Figura 60.** Estudio comparativo de los niveles de hierro (mg/Kg) entre los dos métodos de extracción del aceite de argán.

Según la revisión bibliográfica efectuada, los valores obtenidos resultan similares o ligeramente superiores a los recogidos en otros estudios realizados en distintos aceites vegetales comestibles, como se muestran en la **Tabla 23**.

<b>Tabla 23.</b>			
<b>Presencia de Fe en aceites vegetales comestibles según diversos estudios.</b>			
<b>Tipo de aceite</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Fe (mg/Kg)</b>	<b>Referencia</b>
Oliva virgen	-	1,280-4,830	Vioque y Villagrau, 1967
Oliva virgen	-	3,490	Vioque <i>et al.</i> 1968
Oliva virgen	Italia	0,556	Solinas <i>et al.</i> 1984
Oliva virgen	España	0,426-0,694	Viladrich <i>et al.</i> 1986
Oliva virgen	Italia	0,180-0,370	Cichelli <i>et al.</i> 1992
Oliva virgen	Italia	0,240-0,640	Cichelli <i>et al.</i> 1992
Oliva virgen	Italia	0,083-1,795	Di Battista <i>et al.</i> 1993
Oliva virgen extra	España	0,237-0,290	Martín Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva virgen	España	1,4-1,73	Martín Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva refinado	España	0,158-0,203	Martín Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva virgen	Italia	0,045-1,575	De Leonardis <i>et al.</i> 2000a
Oliva virgen extra	Italia	0,053±0,024 <sup>a</sup>	De Leonardis <i>et al.</i> 2000a
Oliva virgen	Italia	0,517±0,015 <sup>a</sup>	De Leonardis <i>et al.</i> 2000b
Oliva virgen extra	Italia	0,053±0,024 <sup>a</sup>	De Leonardis <i>et al.</i> 2000b
Oliva refinado	Italia	0,076	De Leonardis y Macciola, 2002
Oliva virgen	España	0,13-16,19	Nake <i>et al.</i> 2000
Oliva virgen	España	0,09-0,75	Lendínez, 2004
Orujo oliva	-	1,27	Pinto <i>et al.</i> 2006
Oliva	-	1,32-2,92	Pinto <i>et al.</i> 2006
Soja	-	1,74	Pinto <i>et al.</i> 2006

<sup>a</sup>Media ± desviación estándar.

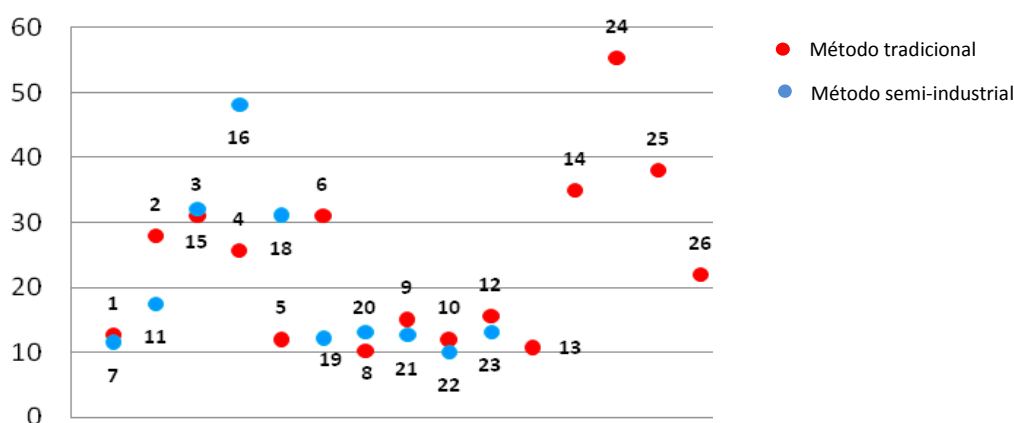
<b>Tabla 23.</b>			
<b>Presencia de Fe en aceites vegetales comestibles según diversos estudios. Continuación.</b>			
<b>Tipo de aceite</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Fe (mg/Kg)</b>	<b>Referencia</b>
Cacahuete	-	1,08	Pinto <i>et al.</i> 2006
Oliva virgen	-	0,893	Benincasa <i>et al.</i> 2007
Girasol	Croacia	15,0-15,8	Cindric <i>et al.</i> 2007
Sésamo	Croacia	14,40-15,2	Cindric <i>et al.</i> 2007
Avellana	Croacia	15,4-15,5	Cindric <i>et al.</i> 2007
Soja	Croacia	23,1-23,5	Cindric <i>et al.</i> 2007

En el estudio realizado por Roca (1997) en aceites de oliva producidos en España (antes mencionados), aparecen concentraciones medias de hierro muy similares en aceite de oliva virgen y aceite de oliva, resultando superiores en aceites de orujo de oliva. Estos valores son 0,48 mg/Kg en aceite de oliva virgen, 0,44 mg/Kg en aceite de oliva y 0,706 mg/Kg en aceite de orujo de oliva. Los resultados de Fe obtenidos en las muestras de aceite de argán son más próximos a los del aceite de orujo de oliva.

Garrido *et al.* (1993) encuentran una correlación directa ( $p < 0,001$ ) entre la presencia de Fe en aceites vegetales comestibles y el grado de acidez del aceite. En nuestro estudio no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre los niveles de Fe y el grado de acidez de las muestras de aceite de argán ( $r = 0,132$ ;  $p = 0,528$ ). Varios estudios han descrito los efectos nocivos del hierro en el flavor y estabilidad oxidativa de los aceites (Choe y Min, 2006).

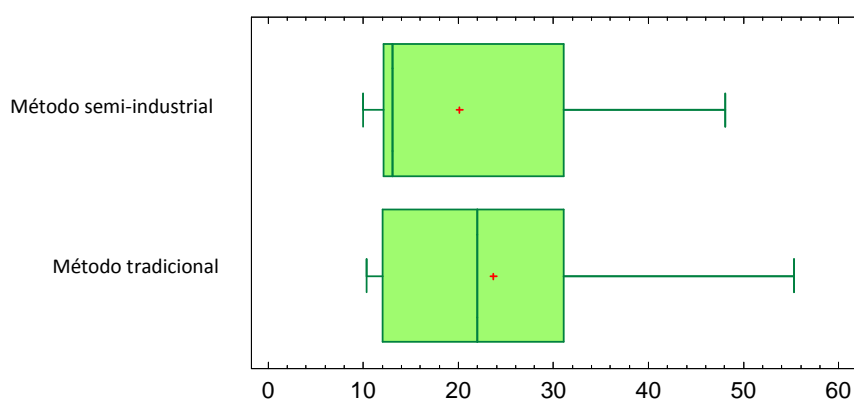
### 2.3. Cromo

En la **Figura 61** se representan gráficamente los valores de Cr obtenidos en las muestras de aceite de argán analizadas.



**Figura 61.** Niveles de Cr ( $\mu\text{g/Kg}$ ) en las muestras de aceite de argán analizadas.

Las concentraciones medias de cromo oscilan para el método de extracción tradicional entre 10,30-55,30  $\mu\text{g/Kg}$ , con un CV del 54,76% y para el método semi-industrial entre 10,00-48,10  $\mu\text{g/Kg}$ , con un CV del 59,06%. Del análisis estadístico de los valores obtenidos, podemos deducir que el contenido en cromo en el aceite de argán no está influido por el método de elaboración, no revelando estos datos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de aceites ( $p=0,825$  para test de Cochran y  $p=0,828$  para el test de Bartlett) ni entre medianas ( $p=0,560$  para el test de Mann-Whitney) (**Figura 62**).



**Figura 62.** Estudio comparativo de los niveles de cromo ( $\mu\text{g/Kg}$ ) entre los dos métodos de extracción del aceite de argán.

Las concentraciones medias de cromo encontradas en aceites de oliva producidos en España, analizados por Roca *et al.* (2000), son de 18,145  $\mu\text{g/Kg}$  en aceite de oliva virgen, de 17,44  $\mu\text{g/Kg}$  en aceite de oliva y de 23,223  $\mu\text{g/Kg}$  en aceite de orujo de oliva; las concentraciones resultan muy similares en aceite de oliva virgen y aceite de oliva. Otros datos bibliográficos, aparecen en la **Tabla 24**.

Nuestros datos son similares a los obtenidos por otros autores, observándose no obstante, una amplia variabilidad en la presencia de este elemento en los diferentes aceites vegetales comestibles.

Diversos autores (Solinas *et al.* 1984; Di Battista *et al.* 1993) comparan la influencia del proceso de obtención del aceite de oliva virgen sobre el contenido de Cr, comprobando que existen diferencias aunque no son muy marcadas. El proceso tecnológico puede incrementar los niveles naturales en la materia prima debido a la transferencia del elemento desde maquinaria, utensilios, contenedores (por ejemplo, utensilios y contenedores de cerámica) y envases. Este metal es ampliamente utilizado a nivel industrial, por ejemplo en materiales de acero inoxidable y su uso no parece que pueda

ser sustituido por otros compuestos en las próximas décadas, sino que tiende a incrementarse.

**Tabla 24.**

Presencia de Cr en aceites de oliva según diversos estudios.

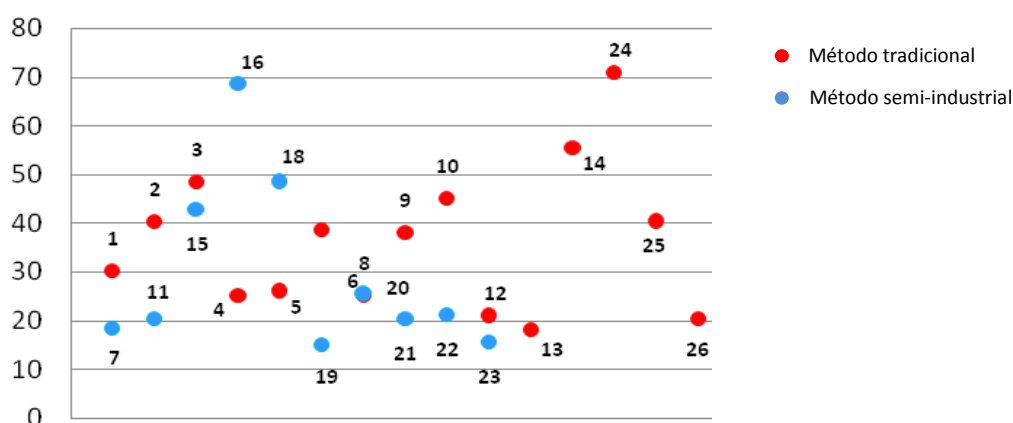
Tipo de aceite	Procedencia	Cr ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Referencia
Oliva virgen	Italia	11-40,3	Solinas <i>et al.</i> 1984
Oliva virgen	Italia	2-33	Calapaj <i>et al.</i> 1986
Oliva virgen	Italia	11,0-40,3	Di Battista <i>et al.</i> 1993
Oliva virgen	Francia	< 1-31	Lacoste <i>et al.</i> 1993
Oliva virgen extra	España	< LD	Martín-Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva virgen	España	< LD	Martín-Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva	España	< LD	Martín-Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva refinado	España	< LD	Martín-Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva virgen extra	España	44,17	Lendínez, 2004
Orujo oliva	España	20,14-26,15	Roca <i>et al.</i> 2000
Oliva virgen	España	Nd-41,51	Roca <i>et al.</i> 2000
Oliva	España	Nd-31,38	Roca <i>et al.</i> 2000
Oliva virgen extra	España	9,37-44,17	Lendínez <i>et al.</i> 2001
Oliva virgen	España	19,12	Lendínez <i>et al.</i> 2001
Oliva virgen	Italia	116,49-437,4	Benincasa <i>et al.</i> 2007

LD = Límite de detección de la técnica analítica aplicada.

Nd = No detectable.

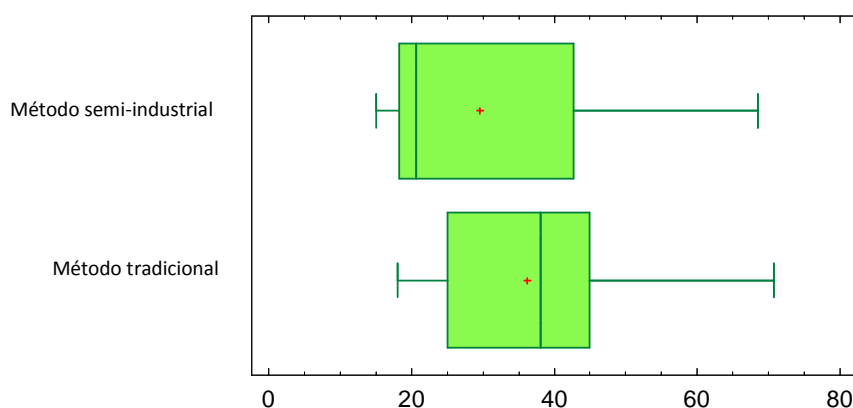
## 2.4. Manganeso

En la **Figura 63** se representan gráficamente los valores de manganeso en las muestras de aceite de argán analizadas.



**Figura 63.** Niveles de Mn ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en las muestras de aceite de argán analizadas.

Las concentraciones oscilan para el método tradicional entre 18,1-70,75  $\mu\text{g/Kg}$ , y para el método semi-industrial entre 15,00-68,5  $\mu\text{g/Kg}$ . No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de aceites. No hay diferencia estadística en la variabilidad para ambos métodos ( $p=0,528$  para el test de Cochran y  $p=0,533$  para el test de Bartlett) ni entre medianas ( $p=0,157$  para el test de Mann-Whitney) (**Figura 64**).



**Figura 64.** Estudio comparativo de los niveles de manganeso ( $\mu\text{g/Kg}$ ) entre los dos métodos de extracción del aceite de argán.

Roca *et al.* (2000) en un estudio realizado en aceites de oliva, concluyen que los valores más elevados de Mn aparecen en aceite de orujo de oliva, seguido de aceite de oliva virgen y aceite de oliva. Establecen que la variabilidad puede deberse al contenido del elemento en el suelo de cultivo, y observan diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre los aceites procedentes de distintas provincias (Jaén, Córdoba, Granada, Sevilla), hecho que atribuyen a la influencia del suelo de cultivo.

Otros datos recogidos en bibliografía se muestran en **Tabla 25**, si bien resultan escasos los estudios efectuados sobre este elemento. Solinas *et al.* (1984) detectan ligeras diferencias en el contenido de Mn en aceites de oliva virgen obtenidos por distintos procedimientos, mientras que Di Battista *et al.* (1993) encuentran valores superiores en aceite de oliva virgen obtenido por presión.

Nuestros datos son similares o inferiores a los resultados obtenidos por otros autores y no superan los niveles críticos que pueden producir un efecto catalítico en el proceso de oxidación. Concentraciones de Mn del orden de 0,6 ppm provocan una disminución del 50% en la resistencia de una grasa sometida a un ensayo acelerado de oxidabilidad (Kiritsakis, 1992). Prevot *et al.* (1997) señalan que su actividad catalítica se sitúa entre la de Cu y Fe. Otros autores indican el siguiente orden en cuanto a actividad prooxidante:  $\text{Co} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Fe} > \text{Ni}$ , pero puntualizan que cuando se trata de sustratos más insaturados, este orden podría modificarse (Kiritsakis, 1992).

**Tabla 25.**

Presencia de Mn en aceites de oliva según diversos estudios.

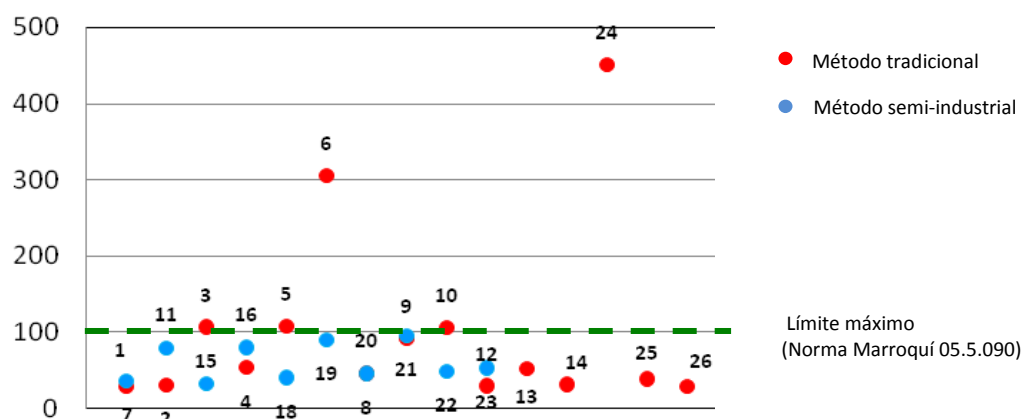
Tipo de aceite	Procedencia	Mn ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Referencia
Oliva virgen	España	13-26	Vioque <i>et al.</i> 1968
Oliva virgen	Italia	3,8- 38,2	Solinas <i>et al.</i> 1984
Oliva virgen	Italia	Nd-104,6	Di Battista 1993
Orujo oliva	España	13,90-296,35	Roca <i>et al.</i> 2000
Oliva virgen	España	13,21-242,46	Roca <i>et al.</i> 2000
Oliva	España	16,11-174,18	Roca <i>et al.</i> 2000
Oliva virgen	Italia	Nd-25,2	Benincasa <i>et al.</i> 2007

Nd = No detectable.

## 2.5. Plomo

Debido a su carácter tóxico, la determinación de plomo es importante en cualquier producto alimenticio; este elemento es capaz de producir trastornos a pequeñas dosis y se acumula con facilidad, en distintos órganos diana, como hígado y riñón.

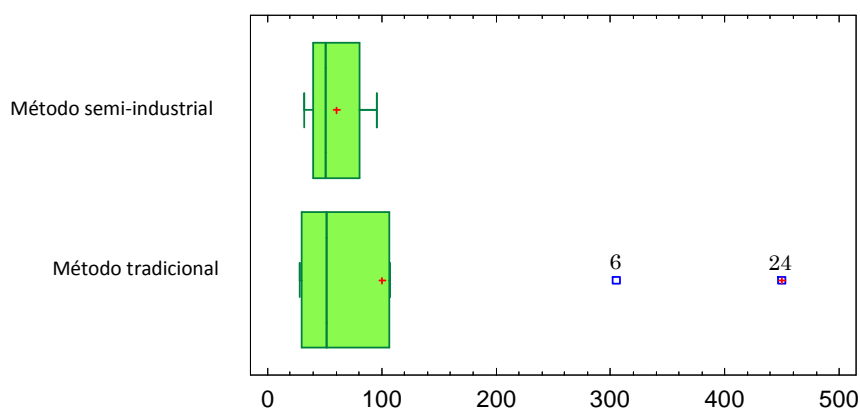
Las concentraciones obtenidas por el método tradicional oscilan entre 28,50-450,00  $\mu\text{g/Kg}$ . En las muestras de aceite de argán obtenidas mediante el método semi-industrial, los niveles de plomo varían entre 32,00-95,7  $\mu\text{g/Kg}$ . Observamos una alta variabilidad en cada uno de los grupos; las concentraciones más elevadas aparecen en el método tradicional (CV=119,79%), mientras que el método semi-industrial presenta un CV=39,88%. La **Figura 65** muestra como se distribuyen los datos del total de muestras analizadas, en función del método de obtención del aceite. Se detectan diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de elaboración, para un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,0001$  para test de Cochran y  $p < 0,0001$  para test de Barlett) (**Figura 66**).



**Figura 65.** Niveles de Pb ( $\mu\text{g/Kg}$ ) en las muestras de aceite de argán analizadas.



El análisis de plomo y sus contenidos máximos en aceites vegetales comestibles están regulados por la Legislación Española (Presidencia del Gobierno, 1983) así como por la Normativa Marroquí en el aceite de argán. Del total de muestras analizadas, las muestras 3, 5, 6, 10 y 24, obtenidas por el método tradicional, superan el límite máximo de 0,1 mg/Kg permitido por la Normativa Marroquí y por la Comisión del Codex Alimentarius en aceites vegetales comestibles (FAO/WHO, 2003).



**Figura 66.** Estudio comparativo de los niveles de plomo ( $\mu\text{g/Kg}$ ) entre los dos métodos de extracción del aceite de argán.

En estudios realizados sobre el contenido de Pb en aceites de oliva y aceite de orujo de oliva producidos en Andalucía, Roca *et al.* 2001 obtienen valores medios de 44,29  $\mu\text{g/Kg}$  en aceite de oliva virgen, de 11,52  $\mu\text{g/Kg}$  en aceite de oliva y de 142,05  $\mu\text{g/Kg}$  en aceite de orujo de oliva. La **Tabla 26** resume los datos aportados por otros autores, observándose como en muchos casos, los valores resultan inferiores al límite de detección de la técnica analítica; en general, nuestros resultados son más elevados.

La presencia de plomo puede atribuirse al contenido en los suelos (concentraciones naturales y debido a algunas sustancias añadidas como fertilizantes, agua de riego, contaminación ambiental, etc.). El plomo persiste en el medioambiente y tiene una larga vida media biológica. El proceso de absorción por la planta está influenciado por el pH, características fisicoquímicas de los suelos, la especie vegetal implicada y la presencia de otros elementos. Sin embargo, la influencia de la tecnología alimentaria ha sido ampliamente descrita y es un factor adicional que hay que considerar (Cabrera *et al.* 1995). Por lo tanto, una mayor industrialización del proceso de extracción del aceite de argán, eliminando el uso de piedras y materiales similares (rotura del hueso manual, envases cerámicos, utensilios metálicos, etc.) podría contribuir a reducir la presencia de plomo en este aceite.

**Tabla 26.**  
Presencia de Pb en aceites vegetales comestibles según diversos estudios.

Tipo de aceite	Procedencia	Pb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Referencia
Oliva virgen	Italia	13 (LD <sup>a</sup> -52,6)	Solinas <i>et al.</i> 1984
Oliva virgen	España	31 $\pm$ 5	Puig-Deu <i>et al.</i> 1990
Oliva virgen	Italia	< LD-271,7	Di Battista <i>et al.</i> 1993
Oliva virgen	Francia	5-85	Lacoste <i>et al.</i> 1993.
Oliva virgen extra	España	< LD	Martín-Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva virgen	España	< LD	Martín-Polvillo <i>et al.</i> 1994
Oliva virgen	Italia	Nd-271,7	Di Battista <i>et al.</i> 1993
Oliva virgen	España	12-24	Castillo <i>et al.</i> 1999
Oliva virgen	Italia	7,3-20,6	Lo Coco <i>et al.</i> 2000
Girasol	España	Nd-167,58	Roca <i>et al.</i> 2001

<sup>a</sup>LD= Límite de detección de la técnica analítica.

Nd = No detectable.

Una vez estudiadas las posibles correlaciones lineales estadísticamente significativas entre los distintos metales analizados (**Tabla 27**) observamos que entre cobre y cromo existe una correlación directa moderada; sin embargo, entre hierro y cobre y entre manganeso y cromo, se ha encontrado una mayor correlación. Estos elementos están usualmente asociados en maquinaria y materiales empleados en tecnología alimentaria.

	Cu	Fe	Mn	Pb
<b>Cr</b>	r= 0,656 p< 0,001	r= 0,450 p= 0,024	r= 0,859 p< 0,001	r= 0,488 p= 0,013
<b>Cu</b>		r= 0,851 p< 0,001	r= 0,730 p< 0,001	r= 0,764 p< 0,001
<b>Fe</b>			r= 0,584 p= 0,002	r= 0,810 p< 0,001
<b>Mn</b>				r= 0,456 p= 0,022

**Tabla 27.** Correlaciones entre los niveles de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb en las muestras de aceite de argán.

Por todo lo expuesto, consideramos que la determinación de metales traza en los aceites vegetales comestibles es un parámetro importante para evaluar su calidad comercial, su estabilidad y por supuesto, sus propiedades nutricionales y organolépticas. Hierro, Cr, Mn y en particular Cu, ejercen un efecto catalítico en el proceso de autooxidación. Los datos obtenidos demuestran la influencia del proceso de extracción en la presencia de metales prooxidativos (Fe, Cu, Cr, Mn) y metales tóxicos (Pb). Una mejora en la tecnología con un proceso más industrializado y un correcto control de producción podría preservar la composición química, flavor, y valor nutricional del aceite de argán virgen. Además, se podría proteger la salud de los consumidores reduciendo la presencia de metales tóxicos.

### 3. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Los resultados experimentales obtenidos en nuestro estudio se muestran en la **Tabla 28**, donde se indica el porcentaje de cada ácido graso. Destacar que, el ácido graso mayoritario en el aceite de argán es el ácido oleico, oscilando en el total de las muestras analizadas entre 36,57-47,70%. En otros aceites de semillas, por ejemplo girasol, oscila entre 15-85%, soja entre 20-35% y colza o nabina entre 50-65% (López y López, 2005). Tuberoso *et al.* (2007), comparan distintos aceites vegetales comestibles y concluyen que el aceite de cacahuete, colza y oliva están caracterizados por una alta cantidad de ácido oleico (58,3, 60,7 y 67,2%, respectivamente). En el aceite de oliva el ácido oleico puede representar un 79% del total de ácidos grasos, ahora bien, esa cantidad puede variar ampliamente, encontrando aceites con un porcentaje de ácido oleico, del orden del 57% y en otros puede incluso alcanzar el 82% (Mataix, 2001; López y López, 2005).

El ácido graso que sigue en cantidad es el ácido linoleico, que en conjunto oscila entre 31,26-40,41%, pero tan sólo una muestra alcanza valores superiores al 40%. En otros aceites de semillas, como son el de soja, oscila entre 45-60%, girasol entre 50-72%, cártamo entre 55-80%, algodón entre 33-58% y maíz entre 45-65% (López y López, 2005). Estos datos son similares a los encontrados por Tuberoso *et al.* (2007), que obtiene para los aceites de semilla de calabaza, soja, maíz, girasol y semilla de uva, un contenido de ácido linoleico de 47,1, 50,8, 53,6, 55,4 y 70,8%, respectivamente. En aceite de oliva, el ácido linoleico varía entre un 4 y 20% (Mataix, 2001).

En cuanto al ácido  $\alpha$ -linolénico, está presente en el aceite de argán en cantidades minoritarias, oscilando entre 0,09-2,63%. Otros estudios en aceite de argán, indican concentraciones en ácido  $\alpha$ -linolénico entre 0,03-0,10% (Hilali *et al.* 2005). En otros aceites de semillas, el contenido en este ácido graso esencial oscila para el aceite de soja entre 5-10%, girasol  $\leq 0,2\%$ , cártamo  $\leq 1\%$  y maíz  $\leq 1,5\%$  (López y López, 2005). El aceite de semilla de lino es rico en ácido  $\alpha$ -linolénico (50,6%) (Tuberoso *et al.* 2007). Normalmente, esta alta cantidad en ácido  $\alpha$ -linolénico, puede constituir un problema, ya que reduce la resistencia a la oxidación del aceite, especialmente cuando se somete a altas temperaturas (Chu y Kung, 1998).

Los ácidos grasos saturados más característicos en el aceite de argán son el ácido palmítico y el esteárico, siendo más abundante el primero que el segundo, oscilando el palmítico entre 11,74-13,94% y el esteárico del 4,91-8,29%.

**Tabla 28.**  
Determinación de ácidos grasos (%) en las muestras de aceite de argán .

Ácido graso	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Muestra 13	Muestra 14
Mirístico C14:0	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12	0,13	0,13	0,12	0,12	0,13	0,13	0,16	0,16
Palmítico C 16:0	12,06	12,79	12,55	12,20	12,95	12,13	12,26	13,05	12,57	12,41	12,64	12,3	13,94	13,43
Palmitoleico C 16:1	0,09	0,12	0,09	0,09	0,10	0,09	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,14	0,16
Margárico C17:0	0,07	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,06	0,06	0,06	0,05	0,07	0,07	0,07
Margaroleico C17:1	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02
Estearico C 18:0	4,91	5,25	5,30	5,50	5,69	5,21	5,67	5,44	8,29	6,02	6,16	7,01	5,90	6,60
Oleico C 18:1	39,66	46,73	36,57	45,43	46,37	45,03	44,98	42,04	42,89	41,37	47,41	44,00	46,83	44,97
Linoleico C 18:2	38,88	32,18	40,41	34,58	31,26	35,15	35,34	36,16	33,78	36,17	31,96	33,33	31,59	33,08
Aráquico C 20:0	0,36	0,36	0,60	0,35	0,37	0,37	0,35	0,38	0,40	0,39	0,34	0,33	0,38	0,38
$\alpha$ -Linolénico C 18:3	1,93	0,25	2,63	0,10	0,17	0,50	0,11	1,52	0,45	0,38	0,09	0,18	0,47	0,43
Gadoleico C 20:1	0,39	0,43	0,33	0,42	0,76	0,42	0,42	0,37	0,41	0,40	0,43	0,41	0,42	0,4
Behénico C 22:0	0,22	0,16	0,29	0,14	0,15	0,16	0,12	0,20	0,17	0,16	0,12	0,19	0,19	0,13
Lignocérico C 24:0	0,13	0,15	0,16	0,05	0,09	0,08	0,06	0,09	0,08	0,09	0,06	0,07	0,17	0,15

Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán

<b>Tabla 28.</b>												
<b>Determinación de ácidos grasos (%) en las muestras de aceite de argán. Continuación.</b>												
<b>Ácido graso</b>	<b>Muestra 15</b>	<b>Muestra 16</b>	<b>Muestra 17</b>	<b>Muestra 18</b>	<b>Muestra 19</b>	<b>Muestra 20</b>	<b>Muestra 21</b>	<b>Muestra 22</b>	<b>Muestra 23</b>	<b>Muestra 24</b>	<b>Muestra 25</b>	<b>Muestra 26</b>
Mirístico C14:0	0,13	0,13	Nd	0,12	0,13	0,12	0,13	0,15	0,13	0,10	0,13	0,14
Palmítico C 16:0	12,50	12,54	11,65	11,81	12,12	12,19	12,65	12,74	12,34	11,74	12,88	12,76
Palmitoleico C 16:1	0,09	0,10	Nd	0,08	0,10	0,09	0,09	0,10	0,09	0,10	0,11	0,01
Margárico C17:0	0,07	0,07	Nd	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	Nd
Margaroleico C17:1	0,03	0,03	Nd	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02
Estearico C 18:0	5,92	5,68	3,42	6,12	7,14	5,37	6,35	5,35	7,01	4,92	5,52	6,43
Oleico C 18:1	45,10	46,49	41,45	42,78	45,39	47,70	45,08	47,23	45,67	40,08	47,09	44,22
Linoleico C 18:2	32,57	32,76	39,73	34,24	33,26	32,85	34,02	32,66	33,16	39,31	32,79	34,68
Aráquico C 20:0	0,37	0,35	Nd	0,34	0,32	0,35	0,40	0,35	0,35	0,36	0,36	0,43
$\alpha$ -Linolénico C 18:3	0,24	0,10	Nd	0,11	0,09	0,10	0,12	0,18	0,10	2,30	0,11	0,13
Gadoleico C 20:1	0,41	0,42	Nd	0,40	0,43	0,44	0,37	0,43	0,43	0,37	0,41	0,35
Behénico C 22:0	0,15	0,13	Nd	0,11	0,12	0,13	0,15	0,13	0,13	0,23	0,12	0,15
Lignocérico C 24:0	0,42	0,24	Nd	0,21	0,22	0,28	0,26	0,22	0,23	0,17	0,26	0,22

Nd = No detectado.

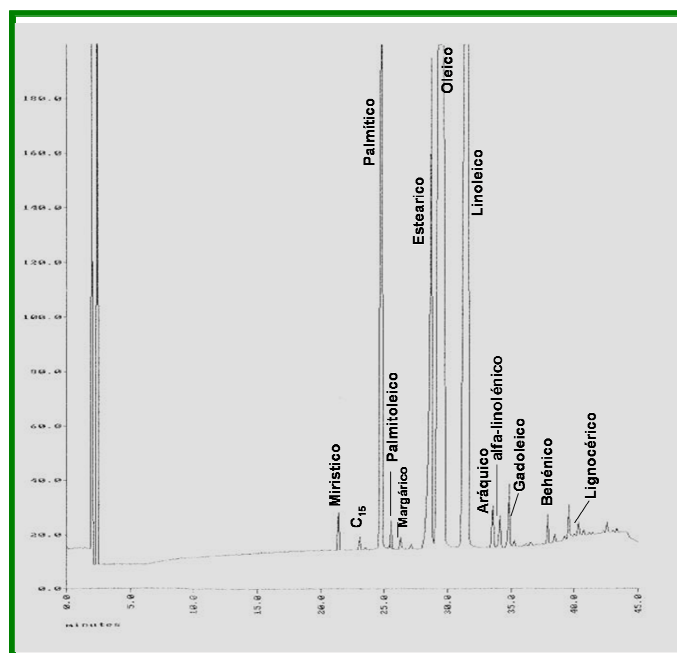
**Tabla 29.**

Composición en ácidos grasos de algunos aceites vegetales comestibles (%) (Fuente: López y López, 2005).

Ácido graso	Soja	Girasol	Cártamo	Algodón	Maíz	Colza	Cacahuete	Coco	Argán <sup>a</sup>
Láurico	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	46-50	≤ 0,1
Mirístico	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 1,2	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,3	17-19	0,1
Palmítico	7-12	3,5-8,0	4-10	17-29	9-17	2-7	8-13	8-10	10,3
Palmitoleico	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 0,1	≤ 1	≤ 0,2	≤ 1	≤ 0,3		0,1
Estearico	2-6	3-7	2-4	1-3	1-3	1-3	3-5	2-3	4,2
Oleico	20-35	15-85	11-25	16-44	22-44	50-65	38-63	5-7	43,8
α-linoleico	45-60	50-72	55-80	33-58	45-65	15-30	18-42	1-2	36,9
Linolénico	5-10	≤ 0,2	≤ 1		≤ 1,5	6-14	≤ 1	≤ 0,2	3,8
Aráquico	≤ 1	≤ 0,6	≤ 1	≤ 0,3	≤ 1	≤ 1,5	1-3	≤ 0,2	0,4
Gadoleico		≤ 0,3				≤ 4,5	≤ 1	≤ 0,2	0,3
Behénico	≤ 0,5	≤ 1	≤ 1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,5	2-5		0,1
Lignocérico						≤ 0,2	1-3		0,0

<sup>a</sup> Fuente: Řezanka y Řezanková (1999).

La **Figura 67** recoge el cromatograma correspondiente a una muestra de aceite de argán y las concentraciones de los diferentes ácidos grasos.



T. retención (min)	C (%)	Nombre
3,42	10,3	Ac. Palmítico
4,86	0,6	Ac. Palmitoleico
5,92	3,9	Ac. Estearico
7,37	76,2	Ac. Oleico
8,82	7,6	Ac. Linoleico
10,85	0,3	Ac. α-Linolénico
11,87	0,8	Ac. Aráquico

**Figura 67.** Cromatograma de una muestra de aceite de argán procesada como se indica en el texto.

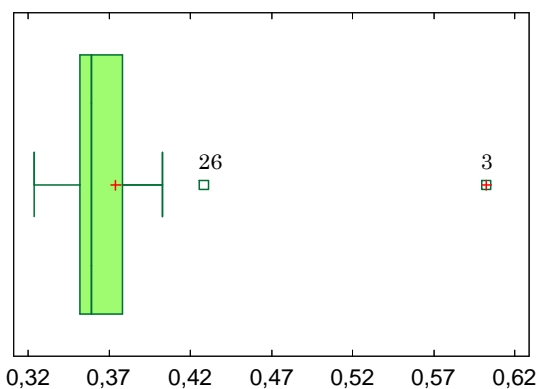
Del tratamiento estadístico de los datos mostrados en la **Tabla 28**, resaltamos los siguientes parámetros que se resumen en la **Tabla 30**.

**Tabla 30.**  
**Datos estadísticos de los aceites de argán analizados.**

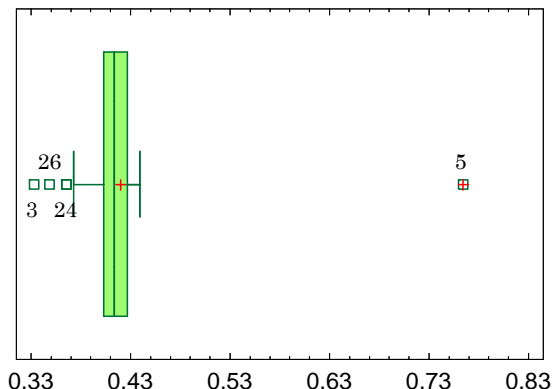
	Media	Mediana	Varianza	SD	Valor mínimo	Valor máximo	Rango	CV(%)
Mirístico	0,13	0,13	0,0001	0,01	0,10	0,16	0,05	9,13
Palmítico	12,54	12,54	0,23	0,48	11,74	13,94	2,20	3,86
Palmitoleico	0,10	0,10	0,0006	0,02	0,01	0,16	0,14	25,75
Margárico	0,07	0,07	0,0002	0,02	0,00	0,09	0,09	22,85
Margaroleico	0,03	0,02	0,0001	0,01	0,01	0,04	0,03	30,73
Estearico	5,95	5,69	0,63	0,80	4,91	8,29	3,37	13,37
Oleico	44,44	45,08	7,61	2,76	36,57	47,70	11,12	6,20
Linoleico	34,25	33,33	5,70	2,39	31,26	40,41	9,15	6,97
Aráquico	0,37	0,36	0,003	0,05	0,32	0,60	0,28	14,24
$\alpha$ -linolénico	0,51	0,18	0,54	0,74	0,09	2,63	2,54	144,05
Gadoleico	0,42	0,41	0,01	0,08	0,33	0,76	0,43	18,32
Behénico	0,16	0,15	0,0018	0,04	0,11	0,29	0,17	26,96
Lignocérico	0,17	0,16	0,01	0,09	0,05	0,42	0,36	53,78

Podemos destacar que algunos ácidos grasos presentan una gran dispersión. Los ácidos grasos con mayor variabilidad son lignocérico,  $\alpha$ -linolénico y margaroleico, que muestran un coeficiente de variación superior al 30% debido posiblemente a diversos factores como la influencia del suelo de cultivo, edad de las plantas, método de obtención, entre otros (Nerd *et al.* 1993). También, se han detectado algunos valores atípicos (*outliers*) en algunos ácidos grasos como el linoléico, en las muestras 1, 3, 13, 24 y 26, todas obtenidas mediante método tradicional (**Figuras 68-73**).

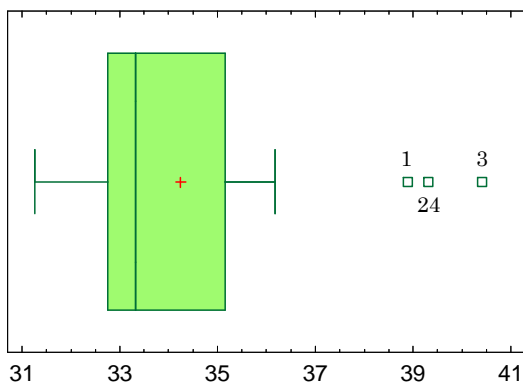
También es de interés, el elevado contenido de algunos ácidos grasos en determinadas muestras; se ha observado un elevado porcentaje de ácido aráquico (0,60%) en la muestra nº 3, frente a una media de 0,37%; el ácido  $\alpha$ -linolénico destaca notablemente en las muestras nº 1, 3 y 24 (1,93%, 2,63%, 2,39%, respectivamente) frente a una media de 0,44%. El ácido gadoleico en la muestra nº 5 (0,76% frente a 0,42%) y ácido lignocérico para la muestra nº 15 (0,42% frente a media de 0,18%). También son destacables las diferencias entre medias de ambos métodos de elaboración para el ácido  $\alpha$ -linolénico (0,77% método tradicional frente 0,13% método semi-industrial). Estas variaciones podrían emplearse como marcadores para determinar el origen geográfico de los aceites de argán que se han podido ir adaptando a lo largo del tiempo a las diferentes zonas de cultivo (Hilali *et al.* 2005).



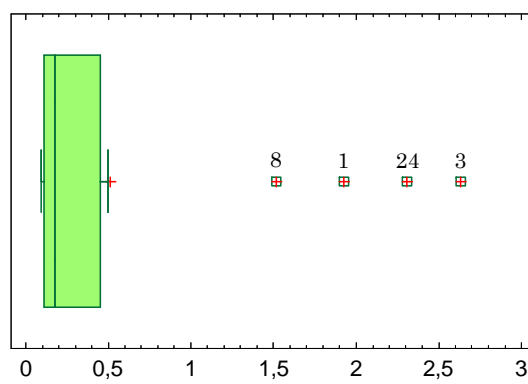
**Figura 68.** Valores atípicos en muestras analizadas para el ácido aráquico (%).



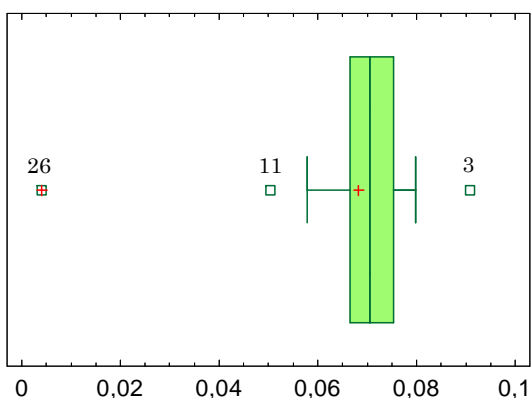
**Figura 69.** Valores atípicos en muestras analizadas para el ácido gadoleico (%).



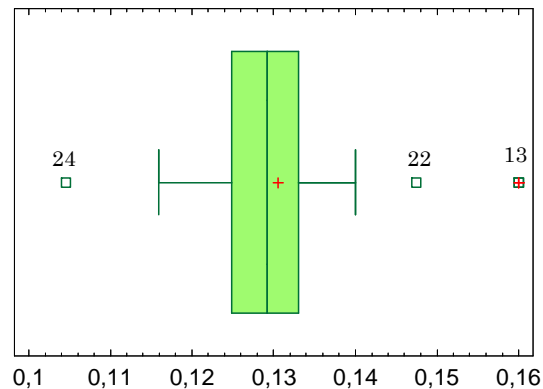
**Figura 70.** Valores atípicos en muestras analizadas para el ácido linoleico (%).



**Figura 71.** Valores atípicos en muestras analizadas para el ácido  $\alpha$ -linolénico (%).



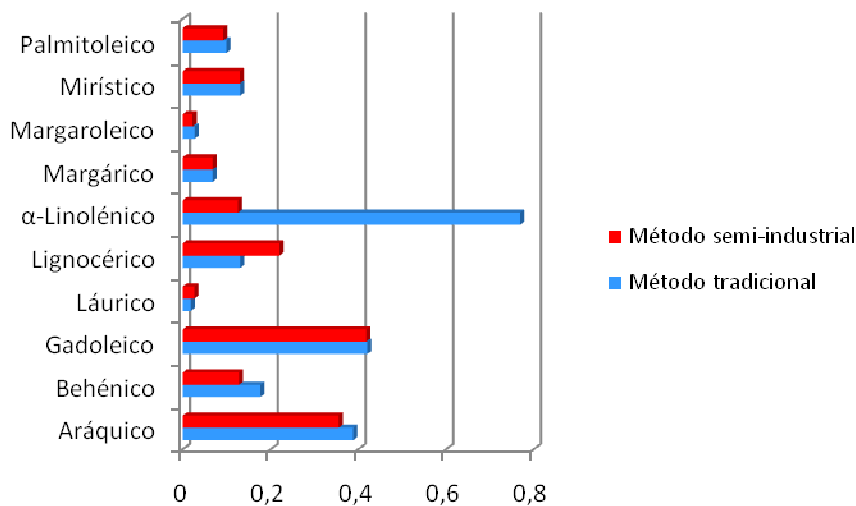
**Figura 72.** Valores atípicos en muestras analizadas para el ácido margárico (%).



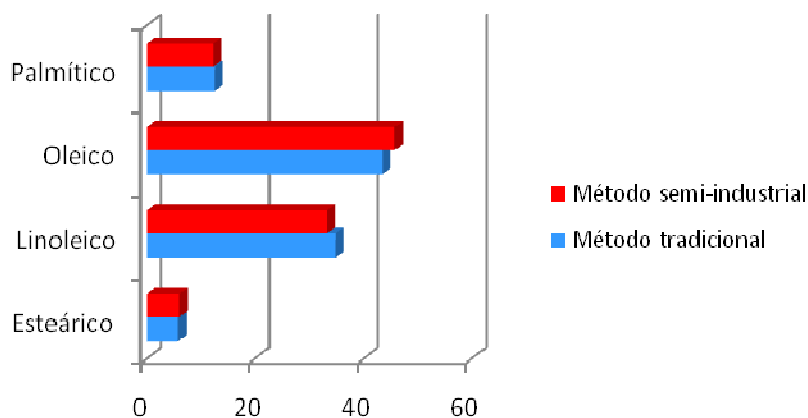
**Figura 73.** Valores atípicos en muestras analizadas para el ácido mirístico (%).



A continuación, en las **Figuras 74 y 75**, se representan los porcentajes en peso de los resultados obtenidos en las muestras de aceite de argán analizadas.



**Figura 74.** Porcentajes medios de ácidos grasos minoritarios de las muestras de aceite de argán analizadas.



**Figura 75.** Porcentajes medios de ácidos grasos mayoritarios de las muestras de aceite de argán analizadas.

Del tratamiento estadístico de las muestras, estudiando el CV y el contraste de la varianza, se observa que no existen diferencias significativas para un nivel de confianza del 95% entre los dos métodos de elaboración para los ácidos grasos esteárico, lignocérico y margaroleico. Hilali *et al.* (2005) no observan ninguna variación en el total de las muestras analizadas, de las cuales los AGI (ácidos oleico y linoleico) componen el 80% de la fracción de ácidos grasos, concluyendo que el origen geográfico y el proceso de obtención tienen poca o ninguna influencia en las cualidades de pureza de los aceites. En nuestro caso, los ácidos grasos mayoritarios, palmítico ( $p=0,032$  para test de Cochran

y  $p=0,046$  para test de Bartlett), oleico ( $p=0,019$  para test de Cochran y  $p=0,029$  para test de Bartlett) y linoleico ( $p=0,001$  para test de Cochran y  $p=0,003$  para test de Bartlett) si muestran diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre ambos métodos de extracción del aceite.

Hilali *et al.* (2005) aprecian que las muestras con menor cantidad de ácido oleico contienen niveles más elevados de ácido linoleico. Igualmente, en nuestro trabajo, las muestras con mayor contenido en ácido oleico (2, 5, 11, 13, 16, 20, 22 y 25) presentan menor cantidad en ácido linoleico. Khallouki *et al.* (2005), obtienen como principal ácido graso del aceite de argán, el oleico (43,1%), seguido del linoleico (36,4%). No detectan ácido  $\alpha$ -linolénico y entre los ácidos grasos saturados, predomina el palmítico (16,4%) sobre el esteárico (4,2%). Estos datos son similares a los obtenidos por Drissi *et al.* (2004) en un estudio que trata de evidenciar las propiedades como antioxidante e hipolipemiente del aceite de argán. Estos autores encuentran palmítico (13%), esteárico (5,1%), oleico (44,8%), linoleico (35,7%) y  $\alpha$ -linolénico (0,1%); en total, un 45% de AGMI, 35% de AGPI y 20% de AGS. Yaghmur *et al.* (2001) sin embargo, obtienen valores ligeramente diferentes a los obtenidos en nuestro estudio, siendo el contenido en ácido oleico de 55,4%, ácido linoleico de 24,4%, mirístico de 0,2%, palmítico de 15,6%, esteárico de 3,2%,  $\alpha$ -linolénico de 0,5%, aráquico de 0,3% y gadoleico de 0,4%.

En nuestro trabajo, al igual que Drissi *et al.* (2004), hemos encontrado un 45,38% de AGMI, un 35,06% de AGPI y un 19,56% de AGS.

La **Tabla 31** muestra las correlaciones entre cada par de variables. Como podemos observar existe una relación significativa indirecta entre el ácido oleico y el ácido linoleico ( $r=-0,914$ ;  $p<0,001$ ), así como entre el ácido oleico y el ácido  $\alpha$ -linolénico ( $r=-0,841$ ;  $p<0,001$ ). Entre los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico también existe correlación significativa directa ( $r=0,863$ ;  $p<0,001$ ). Además podemos observar que un aumento de la concentración de ácido oleico en las muestras, se correlaciona negativamente con la concentración de los ácidos behénico y aráquico ( $r=-0,797$ ;  $p<0,001$  y  $r=-0,612$ ;  $p<0,001$ ; respectivamente). Por el contrario, un aumento de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico, correlaciona positivamente con la concentración de los ácidos behénico y aráquico. Existe correlación directa estadísticamente significativa entre el ácido linoleico y behénico ( $r=0,733$ ;  $p<0,001$ ), entre el ácido linoleico y aráquico ( $r=0,538$ ;  $p=0,006$ ), entre el ácido  $\alpha$ -linolénico y behénico ( $r=0,900$ ;  $p<0,001$ ) y entre el ácido  $\alpha$ -linolénico y aráquico ( $r=0,573$ ;  $p=0,003$ ) (**Figura 76**).

Ácidos grasos	Esteárico	Oleico	Linoleico	Áráquico	$\alpha$ Linolénico	Behénico	Lignocérico	Palmítico	Palmitoleico
Laurico							$r = -0,551$ $p = 0,004$		
Mirístico		$r = 0,413$ $p = 0,040$	$r = -0,479$ $p = 0,015$					$r = 0,800$ $p < 0,001$	
Margárico									$r = 0,589$ $p = 0,002$
Margaroleico	$r = -0,548$ $p = 0,004$				$r = 0,457$ $p = 0,022$	$r = 0,439$ $p = 0,028$			
Esteárico					$r = -0,417$ $p = 0,038$				
Oleico			$r = -0,914$ $p < 0,001$	$r = -0,612$ $p = 0,001$	$r = -0,841$ $p < 0,001$	$r = -0,797$ $p < 0,001$			
Linoleico				$r = 0,538$ $p = 0,006$	$r = 0,863$ $p < 0,001$	$r = 0,733$ $p < 0,001$		$r = -0,447$ $p = 0,025$	
Áráquico					$r = 0,573$ $p = 0,003$	$r = 0,650$ $p < 0,001$			
$\alpha$ -Linolénico						$r = 0,900$ $p < 0,001$			
Palmítico									$r = 0,460$ $p = 0,021$

Tabla 31. Correlaciones entre los ácidos grasos evaluados en las muestras de aceite de argán.

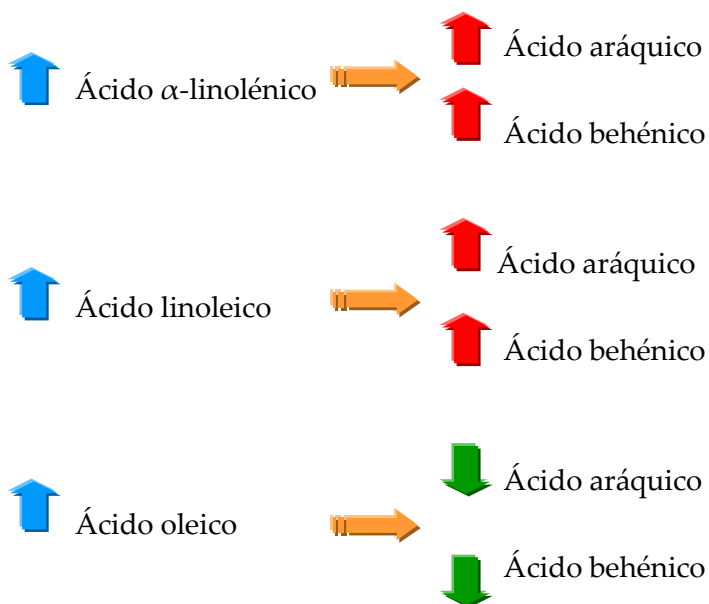


Figura 76. Representación esquemática de las correlaciones estadísticas más significativas entre los ácidos grasos en las muestras analizadas.

## 4. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

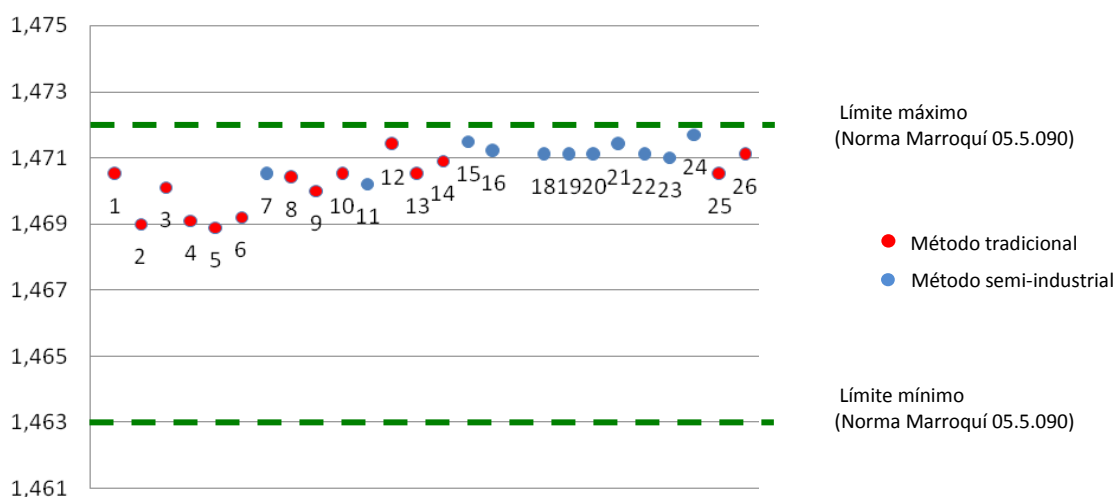
Los valores para el índice de refracción de las muestras de argán analizadas en nuestro estudio oscilan entre 1,4689-1,4717 ( $T^a$  de medida=25°C) y entre 1,4674-1,4699 ( $T^a$  de medida=20°C), siendo la mayoría similares a los valores obtenidos por Hilali *et al.* (2005), con valores comprendidos entre 1,4644-1,4705, medidos a 20°C. El coeficiente de variación es del 0,054%.

**Tabla 32.**

Valores de índice de refracción obtenidos en las muestras de aceite de argán analizadas.

Muestra	Índice de refracción (25°C)	Índice de refracción (20°C)	Muestra	Índice de refracción (25°C)	Índice de refracción (20°C)
1	1,4705	1,4687	14	1,4709	1,4691
2	1,4690	1,4672	15	1,4715	1,4697
3	1,4701	1,4683	16	1,4712	1,4694
4	1,4691	1,4673	17	1,4679	1,4661
5	1,4689	1,4671	18	1,4711	1,4693
6	1,4692	1,4674	19	1,4711	1,4693
7	1,4705	1,4687	20	1,4711	1,4693
8	1,4704	1,4686	21	1,4714	1,4696
9	1,4700	1,4682	22	1,4711	1,4693
10	1,4705	1,4687	23	1,4710	1,4692
11	1,4702	1,4684	24	1,4717	1,4699
12	1,4714	1,4696	25	1,4705	1,4687
13	1,4705	1,4687	26	1,4711	1,4693

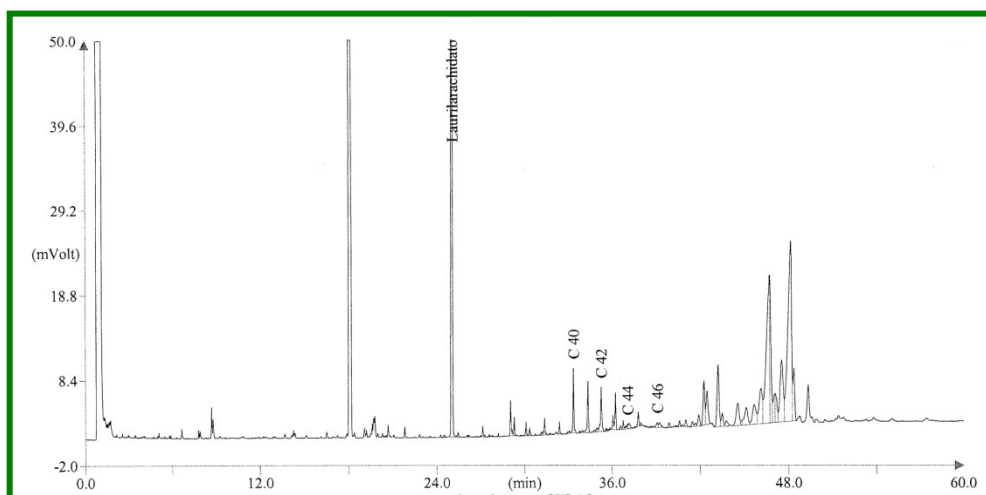
La Norma Marroquí 08.5.090 establece para el índice de refracción un valor mínimo de 1,463 y un valor máximo de 1,472, medido a 25°C. Podemos comprobar que todos los resultados obtenidos se encuentran dentro de este rango (**Figura 77**). Esto nos indica *a priori*, que estas muestras no han sido mezcladas con otro tipo de aceite.



**Figura 77.** Valores de índice de refracción ( $T^a$  de medida a 25°C) en las muestras de aceite de argán analizadas.

## 5. CONTENIDO EN CERAS

Los componentes cuantificados en las muestras de aceite de argán son los correspondientes a los picos con número de carbono par, comprendidos entre los ésteres C<sub>40</sub> y C<sub>46</sub>, como se representa en el cromatograma de la muestra nº 1 (**Figura 78**), en similitud a los determinados en el aceite de oliva ya que no hemos encontrado ningún trabajo publicado al respecto en aceite de argán.



**Figura 78.** Cromatograma de las ceras de la muestra nº 1 de aceite de argán virgen.

En los aceites de oliva, que hemos tomado como referencia, la determinación del contenido en ceras se emplea como parámetro para evaluar su calidad, estando regulado su nivel máximo en 250 mg/Kg para evitar adulteraciones por mezcla con aceites de orujo de aceituna y/o aceites lampantes (Mataix *et al.* 2001). En la Norma Marroquí no se hace mención al contenido en ceras en los distintos tipos de aceite de argán virgen.

El contenido en ceras en las muestras de aceite de argán se muestra en la **Tabla 33**, cada valor corresponde a la media  $\pm$  desviación estándar de la muestra procesada por triplicado. Los niveles de ceras oscilan entre 7,0-95 mg/Kg, con un valor medio de 26,4 mg/Kg y un CV del 103,51%, que nos indica la amplia variabilidad en los resultados obtenidos. En el contenido en ceras pueden influir diferentes factores como la temperatura del procesado, tipo de material de envasado y temperatura de almacenamiento del aceite (Mariani *et al.* 1996).

**Tabla 33.**

Valores del contenido en ceras obtenidos en las muestras de aceite de argán analizadas.

Muestra	Ceras (mg/Kg)	Muestra	Ceras (mg/Kg)
1	95±26,6	14	13±3,64
2	20±5,6	15	14±3,92
3	90±25,2	16	7±1,96
4	11±3,08	17	0±0,00
5	8±2,24	18	13±3,64
6	28±7,84	19	13±3,64
7	10±2,8	20	11±3,08
8	62±17,36	21	14±3,92
9	21±5,88	22	17±4,76
10	54±15,12	23	17±4,76
11	8±2,24	24	85±23,8
12	10±2,8	25	15±4,20
13	11±3,08	26	13±3,64

Diversos estudios relacionan un aumento del contenido en ceras del aceite con un aumento de la temperatura durante el almacenamiento (García *et al.* 1996; Mariani *et al.* 1996); así, las ceras experimentan un gran incremento por encima de 20°C.

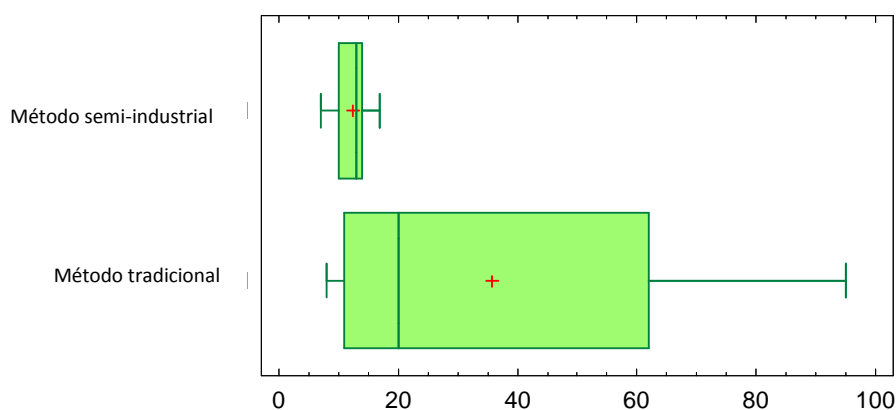
Christopoulo *et al.* (1997), estudian los efectos del tiempo y condiciones de almacenamiento (luz, oscuridad y refrigeración) en diferentes tipos de aceite de oliva. Concluyen que el contenido en ceras es proporcional al de alcoholes totales, que una acidez baja se corresponde con niveles bajos de ceras en el aceite de oliva virgen, y que la temperatura es el principal factor que influye en el contenido de ceras en el aceite. En nuestro caso no hemos encontrado correlación estadísticamente significativa entre el contenido en ceras del aceite de argán y el grado de acidez ( $r=0,290$ ;  $p=0,160$ ).

Estudios realizados por Paganuzzi *et al.* (1997; 1999) sobre el efecto del tiempo y temperatura en aceite de oliva obtenido de variedades italianas, demuestran el progresivo incremento del contenido total en ceras con el paso del tiempo y al someter el aceite a elevadas temperaturas.

En general, la presencia de ceras no altera las propiedades nutricionales del aceite. Si se hallan dentro de los límites establecidos en la normativa, su presencia no debe ser considerada un defecto, sino más bien, el resultado de fenómenos térmicos que afectan momentáneamente al producto. Aun así, se recomienda el almacenamiento de los aceites a temperatura inferior a 20°C, ausencia total de luz y de oxígeno (Samaniego, 2006).

En la **Tabla 34** resumimos los principales parámetros estadísticos del contenido en ceras según el método de extracción del aceite de argán, apareciendo diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, entre el método de extracción tradicional y el semi-industrial ( $p=0,021$  para test de Levene) (**Figura 79**).

<b>Tabla 34.</b>		
<b>Datos estadísticos del estudio del contenido en ceras de las muestras de aceite de argán analizadas.</b>		
	<b>Método tradicional</b>	<b>Método semi-industrial</b>
<b>Media (mg/Kg)</b>	35,73	12,4
<b>Mediana (mg/Kg)</b>	20,0	13,0
<b>Varianza SD (mg/Kg)</b>	32,24	11,6
<b>Valor mínimo (mg/Kg)</b>	8,0	7,0
<b>Valor máximo (mg/Kg)</b>	95,0	17,0
<b>Coefficiente de variación (%)</b>	90,22	27,47



**Figura 79.** Estudio comparativo de los niveles de ceras (mg/Kg) de las muestras de aceite de argán obtenidas según los dos métodos de extracción.

Samaniego (2006) en un estudio realizado en aceite de oliva virgen, durante tres campañas oleícolas, encuentra los siguientes valores de ceras: campaña 2003-2004 los datos oscilan entre 51,5-87,3 mg/Kg, entre 50,6-95,5 mg/Kg en la campaña 2002-2003 y entre 53,2-92,3 mg/Kg en la primera campaña, correspondiente a 2001-2002.

Estos valores son similares a los encontrados en la bibliografía para aceites italianos, 94 mg/Kg (Nota *et al.* 1999), 31-95 mg/Kg (Ranalli *et al.* 1999), y aceites españoles, 27-185 mg/Kg (Pérez-Camino *et al.* 2003).

## 6. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES EN EL ACEITE DE ARGÁN

### 6.1. Polifenoles totales

El ensayo colorimétrico basado en la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu con los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, es el más usado para la determinación cuantitativa de los polifenoles totales en aceites (Gutfinger *et al.* 1981; Velioglu *et al.* 1998; Blekas *et al.* 2002; Szydłowska-Czerniak *et al.* 2008). El método consiste en una calibración con un compuesto fenólico puro, la extracción de los fenoles de la muestra y la medida de la absorbancia después de la reacción generadora de color. El ácido gálico es el compuesto puro, empleado mayoritariamente, al encontrarse en elevada proporción en diversos aceites vegetales comestibles. Se emplea este ensayo por su simplicidad y rapidez en el análisis.

En la **Tabla 35** se exponen los resultados en polifenoles totales de las muestras analizadas. Cada valor se corresponde a la media y desviación estándar de la muestra procesada por triplicado. Los valores oscilan entre 3,96-152,04 mg/Kg (expresados en ácido gálico), con un CV del 58,92%. En esta variabilidad pueden influir parámetros como la temperatura y el tiempo de tostado de la semilla, el empleo de agua en la extracción del aceite, condiciones de almacenamiento (temperatura, luz, presencia de oxígeno), trazas metálicas, presencia de restos de materia orgánica, etc.

**Tabla 35.**

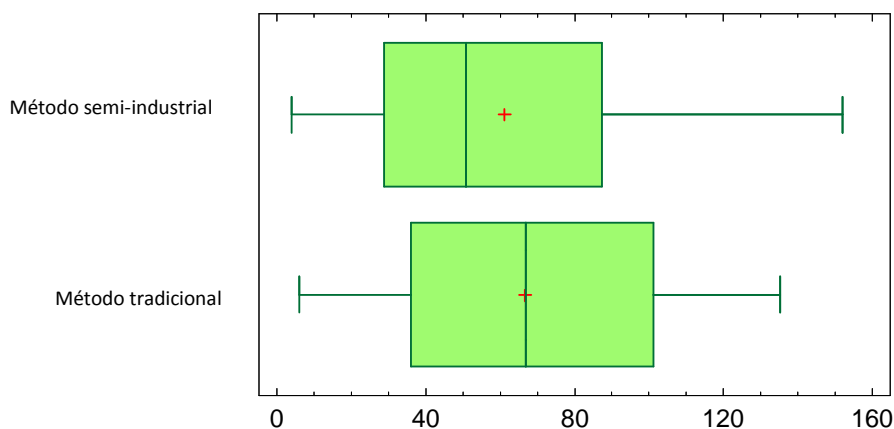
Valores de polifenoles totales en las muestras de aceite de argán analizadas (expresados en ácido gálico).

Muestra	Polifenoles totales (mg/Kg)	Muestra	Polifenoles totales (mg/Kg)
1	66,92±1,34	14	6,07±0,18
2	101,33±3,21	15	36,31±0,82
3	64,03±1,39	16	36,48±0,80
4	19,19±0,69	17	28,82±0,53
5	36,21±0,93	18	3,96±0,40
6	43,27±1,22	19	80,83±0,70
7	107,06±3,40	20	60,84±0,59
8	67,26±2,17	21	28,83±0,55
9	104,63±2,63	22	87,29±0,54
10	65,97±2,41	23	152,04±4,28
11	50,83±1,45	24	135,13±2,24
12	31,48±0,97	25	86,62±0,44
13	101,13±3,18	26	69,27±0,33



Gutiérrez y Fernández (2002) y Romani *et al.* (2007) inciden en las condiciones de almacenamiento y conservación del aceite, como punto crítico para preservar su contenido tanto en polifenoles como en tocoferoles, con gran influencia de la temperatura y exposición a la luz. Es bien conocido, que el contenido en polifenoles y tocoferoles resulta un parámetro importante en la vida media de los aceites de oliva virgen extra, a fin de preservar su composición química y características organolépticas. Ambos aspectos presentan gran relevancia en el aceite de argán, ya que no sólo es de gran interés su valor nutricional, sino también sus preciados atributos sensoriales.

En las muestras obtenidas mediante método tradicional el contenido en polifenoles totales oscila entre 6,07-135,13 mg/Kg (expresado en ácido gálico), con un CV del 53,22%; mientras que las muestras obtenidas por el método semi-industrial oscila entre 3,96-152,04 mg/Kg, con un CV del 67,39%. Del análisis de los valores obtenidos podemos observar que la cantidad de polifenoles totales en el aceite de argán no está influido por el método de elaboración (**Figura 80**), no revelando estos datos diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95,0%, entre la variabilidad en ambos grupos de aceites ( $p=0,500$  para test de Cochran y  $p=0,505$  para el test de Bartlett).



**Figura 80.** Estudio comparativo de los valores obtenidos en las muestras de aceite de argán en cuanto a polifenoles totales (mg/Kg) según los dos métodos de extracción.

En la revisión bibliográfica efectuada, hemos observado que los valores obtenidos en aceite de oliva virgen son bastante dispares, así pueden variar desde 50 a 800 mg/Kg, expresados como ácido cafeico (Ramírez y Quiles, 2005). En el caso del aceite de oliva virgen, el contenido en polifenoles totales se ve altamente influenciado por varios factores ambientales, como son la variedad de aceituna y el grado de maduración de la misma, por el sistema de elaboración y, por último, la conservación del aceite (Pellegrini *et al.* 2001). Okogeri *et al.* (2002) comprueban que en presencia de luz existe un descenso del 45% en el contenido total polifenólico en aceites de oliva vírgenes almacenados

durante 4 meses; si es en ausencia de luz, el descenso es de 39-45% en 6 meses y del 50-62% a los 12 meses.

Valavanidis *et al.* (2004) determinan el contenido en polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en distintos aceites vegetales comestibles, encontrando valores de 170-210 mg/Kg en aceite de oliva virgen extra (Grecia), 60-80 mg/Kg en aceite de soja, 3-4 mg/Kg en aceite de girasol y menos de 1 mg/Kg en aceite de maíz (datos expresados en ácido gálico). El correspondiente análisis por HPLC muestra que los compuestos fenólicos más importantes como antioxidantes (tirosoles, hidroxitirosoles, oleuropeína) están prácticamente ausentes en aceites de girasol y maíz, y en cantidades traza en aceite de soja.

Szydlowska-Czerniak *et al.* (2008) señalan que el proceso de refinado ocasiona una disminución de un 30-80% en el contenido en polifenoles totales. La etapa de neutralización en el proceso de refinado convencional en el aceite de colza, elimina elevadas cantidades de compuestos fenólicos (hasta un 40%) y en aceite de soja, la disminución de estos compuestos antioxidantes en las etapas de desgomado y neutralización se ha cifrado en un 64% (Kania *et al.* 2004).

Pellegrini *et al.* (2001) al estudiar el contenido en polifenoles totales en aceites de oliva italianos, encuentran valores comprendidos entre 73-265 mg/Kg en aceites de oliva virgen extra, entre 14-24 mg/Kg en aceites de oliva y de 4 mg/Kg en aceite de oliva refinado (datos expresados en ácido gálico).

Mataix (2001) recoge que el contenido en polifenoles del aceite de oliva virgen de la variedad *Picual*, que junto con la *Picudo* es la de mayor contenido polifenólico, oscila entre 500-1000 mg de ácido gálico/Kg. En un estudio realizado por Samaniego (2006) en aceite de oliva virgen correspondiente a tres campañas oleícolas diferentes, se obtienen los siguientes valores medios: 1085,92±363,69 mg de ácido gálico/Kg de aceite en la campaña 2003-2004; 1348,61±430,20 mg de ácido gálico/Kg aceite en la campaña 2002-2003 y 1060,92±291,21 mg ácido gálico/Kg aceite en la campaña 2001-2002. El aceite de oliva virgen extra obtenido de la variedad *Arbequina* presenta niveles de polifenoles 5-10 veces menores que los de la *Picual*. En la bibliografía (Tous *et al.* 1997; Uceda *et al.* 2000; Motilva *et al.* 2001; Romero *et al.* 2004) se recogen cantidades muy variables según la zona, con valores en las D.O. de Cataluña y Aragón que oscilan entre 161-319 mg ácido cafeico/Kg (Siurana), 152-443 mg/Kg (Les Garrigues), 149-443 mg/Kg (otras zonas Cataluña) y 347 mg/Kg (Aragón). Estos autores han encontrado que los polifenoles totales de la *Arbequina* son inferiores en la zona de Andalucía (47-185 mg/Kg).

Valavanidis *et al.* (2004) resaltan que el escualeno juega un importante papel en la estabilidad del aceite de oliva virgen frente a la autooxidación pero también destacan que su elevado contenido en polifenoles protege la degradación de los tocoferoles

( $\alpha$ -tocoferol) durante el almacenamiento del aceite y en los tratamientos térmicos culinarios, en los que se producen reacciones hidrolíticas, oxidativas, de isomerización y de polimerización. El aceite de oliva virgen presenta una elevada resistencia a estos cambios en comparación con otros aceites vegetales comestibles. No obstante, Valavanidis *et al.* (2004) también comprueban una elevada estabilidad térmica en los aceites de soja, maíz y girasol que puede atribuirse a su mayor contenido en tocoferoles.

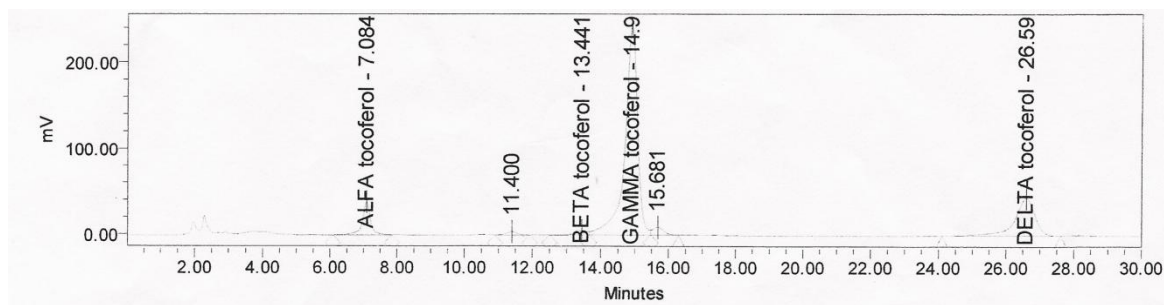
Pellegrini *et al.* (2001) comprueban que los polifenoles totales presentes en el aceite de oliva virgen actúan como efectivos estabilizadores del  $\alpha$ -tocoferol durante el calentamiento del aceite y por tanto, contribuyen al valor nutricional de los alimentos cocinados. Estos autores también señalan el hecho de que una disminución de calidad organoléptica en los aceites, es consecuencia directa de una pérdida en su capacidad antioxidante y de su degradación. Resumiendo, tanto polifenoles como tocoferoles ejercen un papel crucial en la conservación, estabilidad comercial y estabilidad térmica de los aceites vegetales comestibles.

## 6.2. Tocoferoles

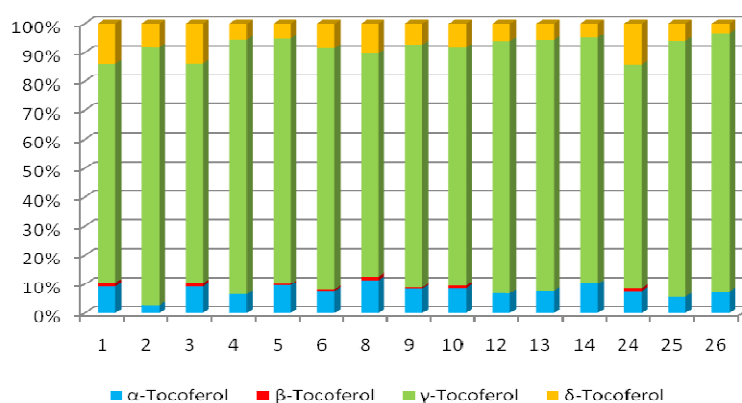
Los tocoferoles actúan como antioxidantes atrapando los hidroperóxidos y deteniendo la reacción en cadena del proceso de autooxidación en grasas y aceites. En concreto, el  $\gamma$ -tocoferol muestra una fuerte actividad antioxidante protegiendo otros compuestos del aceite, como los ácidos grasos (Tuberoso *et al.* 2007). Hilali *et al.* (2005) apuntan que una de las peculiaridades del aceite de argán es su alto contenido en tocoferoles, siendo el  $\gamma$ -tocoferol el isómero mayoritario.

En el presente estudio los tocoferoles se han identificado y cuantificado directamente en las muestras de aceite de argán mediante HPLC en fase reversa, sistema que aporta mayor estabilidad y reproducción de los tiempos de retención. Hay autores que prefieren la cromatografía gaseosa para la determinación de tocoferoles (Botsoglou *et al.* 1998), aunque quizás sea más adecuada para su análisis en otros alimentos. Debido a que la saponificación de los aceites produce una cierta degradación de los tocoferoles, especialmente empleando KOH al 10% en metanol (Khallouki *et al.* 2003), en nuestro estudio los aceites no se han saponificado; se han diluido directamente en n-hexano, previamente a la inyección de la disolución para análisis en la columna del equipo de HPLC.

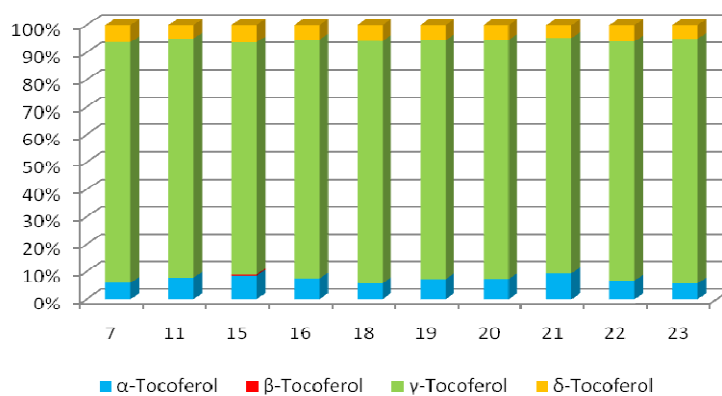
La **Figura 81** corresponde al cromatograma de la muestra de aceite de argán nº 1 y las **Figuras 82 y 83** representan gráficamente los valores obtenidos en función del método de extracción de los aceites.



**Figura 81.** Cromatograma HPLC-UV de una muestra de aceite de argán. Los tocoferoles eluyen en el orden  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol.



**Figura 82.** Contenido en tocoferoles de las muestras de aceite de argán virgen obtenidas mediante método de extracción tradicional.



**Figura 83.** Contenido en tocoferoles de las muestras de aceite de argán virgen obtenidas mediante método de extracción semi-industrial.

La **Tabla 36** muestra el contenido en los diferentes tocoferoles de las muestras de aceite de argán analizadas.

Los niveles de tocoferoles en los aceites de argán estudiados oscilan entre 427,0-654,0 mg/Kg, con un valor medio de 520,52 mg/Kg. Estos datos resultan superiores a los niveles de tocoferoles aportados por diversos autores en el aceite de oliva virgen, que pueden variar desde 50 a 200 mg/Kg (Mataix, 2001).

Khallouki *et al.* (2003), obtienen valores ligeramente superiores a los nuestros, en un estudio llevado a cabo con dos tipos distintos de aceite de argán, de 629 mg/Kg (aceite para cosmética) y 660 mg/Kg (aceite para consumo humano). En este estudio, el isómero mayoritario es  $\gamma$ -tocoferol, representando un 75%, comparado con el  $\delta$ -tocoferol (18%) y el  $\alpha$ -tocoferol (7%). Sin embargo en estudios anteriores, otros autores encuentran que el  $\alpha$ -tocoferol es la forma predominante (69%);  $\beta$  y  $\gamma$ -tocoferol se encuentran en igual proporción (16 y 13%, respectivamente) y  $\delta$ -tocoferol aparece como componente minoritario (2%). Sin duda, estas diferencias en las proporciones de los diferentes isómeros se deben principalmente al método de análisis empleado (Charrouf y Guillaume, 1999). En nuestro trabajo el  $\gamma$ -tocoferol aparece como el isómero predominante.

**Tabla 36.**  
Resultados obtenidos de tocoferoles en los aceites de argán analizados. Datos expresados en mg/Kg.

Muestra	Tocoferoles				
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	Total
1	60	9	494	91	654
2	12	0	380	35	427
3	59	8	488	89	644
4	34	0	451	29	514
5	44	2	386	24	456
6	41	3	446	45	535
7	32	0	464	33	529
8	70	7	473	63	613
9	42	2	415	36	495
10	50	5	478	48	581
11	38	0	423	24	485
12	36	0	455	32	523
13	39	0	437	29	505
14	54	0	451	26	531
15	42	2	416	31	491
16	38	0	440	27	505
17	16	8	21	3	48
18	31	0	469	31	531
19	38	0	453	29	520
20	38	0	450	28	516
21	44	0	401	22	467
22	31	0	396	27	454
23	30	0	460	26	516
24	41	5	416	76	538
25	30	0	465	32	527
26	34	0	406	16	456

En aceites de oliva vírgenes españoles, se han cuantificado niveles de 86,6 mg/Kg (Gimeno *et al.* 2000), 121 mg/Kg (Ruiz *et al.* 1995), 55-324 mg/Kg (Salvador *et al.* 2003). Pellegrini *et al.* (2001) en un estudio realizado en aceites italianos, aportan valores comprendidos entre 251-369 mg/Kg de  $\alpha$ -tocoferol en aceite de oliva virgen extra, entre 146-194 mg/Kg en aceite de oliva y de 138 mg/Kg en aceite de oliva refinado.

Douzane y Bellal (2005), en variedades de olivo argelinas ponen de manifiesto el predominio del  $\alpha$ -tocoferol en todas las variedades estudiadas, seguido del  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. Estos estudios coinciden con los de Speek *et al.* (1985) y Perrin (1992) en los que la concentración de tocoferoles es, por regla general, superior a 100 ppm en los aceites de buena calidad, correspondiendo un 95% del total al  $\alpha$ -tocoferol. Los valores de  $\alpha$ -tocoferol varían según las distintas variedades de aceituna. Estos resultados coinciden con los de Ryan *et al.* (1998) y los de Rahmani (1990). Ryan *et al.* (1998) observan que las cantidades más bajas de tocoferoles totales aparecen en muestras que presentan por lo general una acidez y un índice de peróxidos elevados. En nuestro caso no hemos encontrado ninguna correlación estadísticamente significativa con estos parámetros.

En aceites vegetales de semillas, la cantidad de tocoferoles es elevada, por ejemplo, en maíz y soja (1618,4 y 1794,6 mg/Kg, respectivamente), predominando el  $\gamma$ -tocoferol (más de un 78% del total de tocoferoles); en aceite de semilla de uva y aceite de girasol, el  $\alpha$ -tocoferol es el más importante (139,2 y 494,2 mg/K, respectivamente). El aceite de oliva virgen extra siempre muestra un alto nivel de  $\alpha$ -tocoferol, normalmente 50 veces más que de  $\gamma$ -tocoferol (Tuberoso *et al.* 2007) (Tabla 37).

**Tabla 37.**

Valores de tocoferoles de los aceites vegetales comestibles (mg/Kg, media $\pm$ SD) (Fuente: Tuberoso *et al.* 2007).

Tipo de aceite	$\alpha$ -tocoferol	$\gamma$ -tocoferol	$\delta$ -tocoferol	Tocoferoles totales
Lino	9,5 $\pm$ 0,5	575,0 $\pm$ 17,0	4,1 $\pm$ 0,3	588,5 $\pm$ 35,4
Semilla de uva	139,2 $\pm$ 6,2	3,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0	142,6 $\pm$ 6,4
Maíz	49,5 $\pm$ 3,7	1522,6 $\pm$ 55,1	46,2 $\pm$ 3,3	1618,4 $\pm$ 62,1
Cacahuete	73,2 $\pm$ 6,7	312,0 $\pm$ 19,0	13,4 $\pm$ 0,6	398,6 $\pm$ 26,3
Calabaza	71,4 $\pm$ 2,1	423,1 $\pm$ 14,8	13,6 $\pm$ 0,5	508,1 $\pm$ 17,4
Colza	90,9 $\pm$ 3,4	527,6 $\pm$ 19,4	6,1 $\pm$ 0,3	624,6 $\pm$ 23,0
Soja	92,1 $\pm$ 6,7	1432,3 $\pm$ 80,6	273,2 $\pm$ 12,9	1794,6 $\pm$ 100,2
Girasol	494,2 $\pm$ 15,1	131,0 $\pm$ 6,9	9,2 $\pm$ 0,3	634,4 $\pm$ 22,3
Oliva	212,1 $\pm$ 4,1	4,8 $\pm$ 0,2	Nd	216,8 $\pm$ 4,3

Nd = No detectado.

Fennema (2000) indica que el aceite vegetal comestible con mayor proporción en  $\alpha$ -tocoferol es el de girasol (564 mg/Kg); los aceites donde predomina el  $\gamma$ -tocoferol son el de soja y de maíz (604 y 566 mg/Kg, respectivamente); otros aceites presentan similar proporción de ambos isómeros: el aceite de cacahuete, 141 mg/Kg de  $\alpha$ -tocoferol y 131

mg/Kg de  $\gamma$ -tocoferol; el aceite de algodón, 403 y 383 mg/Kg de  $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferol, respectivamente.

Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008) determinan el contenido total de tocoferoles en aceites de colza y oliva, con valores de 555-690 mg/Kg y 80-190 mg/Kg, respectivamente. Estos autores inciden en que el proceso de refinado al que se somete el aceite de colza puede disminuir hasta en un 10% el contenido en  $\gamma$ -tocoferol.

Espín *et al.* (2000) y Valavanidis *et al.* (2004) recuerdan que los tocoferoles presentan diferente estabilidad a elevadas temperaturas, que disminuye en el orden  $\alpha < \beta < \gamma \approx \delta$ . Gutiérrez y Fernández (2002) señalan que el  $\alpha$ -tocoferol es uno de los antioxidantes naturales que se destruye más fácilmente durante el proceso oxidativo. En este sentido, podemos afirmar que los valores obtenidos de tocoferoles totales y concretamente, de  $\gamma$ -tocoferol en los aceites de argán analizados, van a ejercer una influencia muy positiva sobre la estabilidad comercial y resistencia a tratamientos térmicos de este aceite.

Normalmente altas cantidades de tocoferoles están asociadas con un mayor contenido en AGPI (Caballero *et al.* 2003; Shahidi, 2004). En nuestro estudio, hemos encontrado que existe una correlación directa entre los isómeros  $\beta$  y  $\delta$ -tocoferol y los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico. La correlación también existe entre el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\gamma$ -tocoferol, y estos ácidos grasos. También hemos encontrado correlación entre las formas  $\beta$  y  $\alpha$  (Tabla 38). Estas correlaciones son interesantes tanto desde el punto de vista biológico como de la estabilidad comercial del aceite.

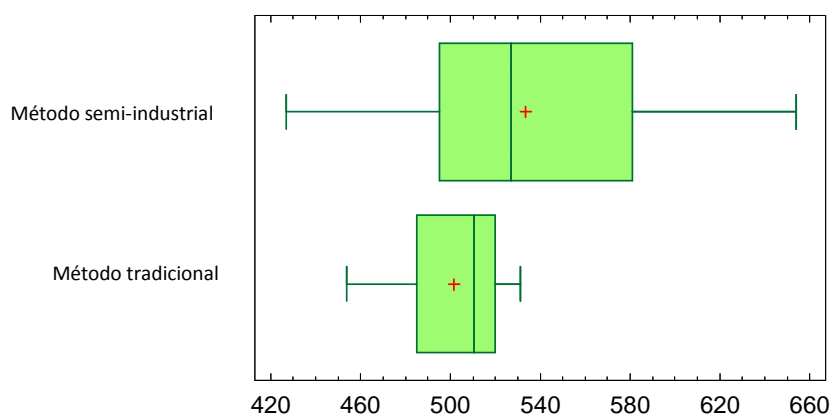
	$\alpha$ -tocoferol	$\beta$ -tocoferol	$\gamma$ -tocoferol	$\delta$ -tocoferol
Ac. linoleico	r= 0,539 p= 0,006	r= 0,816 p< 0,001	r= 0,513 p= 0,009	r= 0,885 p< 0,001
Ac. oleico	r= - 0,613 p= 0,001	r= - 0,836 p< 0,001	r= - 0,490 p= 0,013	r= - 0,850 p< 0,001
Ac. $\alpha$ -linolénico	r= 0,622 p< 0,001	r= 0,874 p< 0,001		r= 0,944 p< 0,001
$\delta$ -tocoferol	r= 0,594 p= 0,002	r= 0,931 p< 0,001	r= 0,497 p= 0,011	
$\beta$ -tocoferol	r= 0,757 p< 0,001		r= 0,447 p= 0,025	
$\gamma$ -tocoferol	r= 0,477 p= 0,016			

**Tabla 38.** Correlaciones entre los valores de los cuatro isómeros del tocoferol y ciertos ácidos grasos mono y poliinsaturados, en las muestras de aceite de argán analizadas.

Hilali *et al.* (2005), comparan los niveles de tocoferoles en aceites de argán obtenidos por dos métodos de extracción diferentes; oscilando entre 633,9 mg/Kg (aceite obtenido

mediante extracción con hexano) y 775,5 mg/Kg (aceite obtenido por el método semi-industrial), siendo en ambos casos superiores a los obtenidos en nuestro estudio. Según este autor, el tostado parece que es el factor que más afecta a los niveles de  $\alpha$ -tocoferol, encontrando que aquellas muestras de aceite preparado con semillas tostadas muestran un nivel en  $\alpha$ -tocoferol inferior que las de aceite elaborado con semillas sin tostar.

En nuestro caso, los aceites obtenidos por el método tradicional presentan valores de tocoferoles totales que oscilan entre 427-654 mg/Kg, con un CV del 12,43%; mientras que las del método semi-industrial oscilan entre 454 y 531 mg/Kg, con un CV del 5,25%. Del estudio estadístico para ambos métodos, se desprende que existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ( $p=0,004$  para test de Cochran y  $p=0,008$  para test de Bartlett) (Figura 84).



**Figura 84.** Estudio comparativo de los niveles de tocoferoles totales obtenidos en los dos métodos de extracción del aceite de argán.

### 6.3. Evaluación de la capacidad antioxidante total del aceite de argán

La capacidad antioxidante total ha sido evaluada a través de una metodología bifuncional, lo que permite considerar dos posibles mecanismos de acción para los compuestos antioxidantes presentes en el aceite de argán. Así, la medida de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP aporta una idea de la capacidad redox de estos compuestos, mientras que los métodos ABTS y DPPH permiten evaluar la capacidad que tiene el aceite para capturar radicales libres presentes en el medio. Por tanto, el análisis de los tres índices para cada muestra proporciona una amplia información global sobre la capacidad antioxidante del aceite.

Se han elegido estos tres métodos porque son los más empleados en bibliografía, lo que hace que *a priori*, la comparación con los datos publicados por otros autores en otros



aceites vegetales comestibles, especialmente aceite de oliva virgen, sea más fácil. Pellegrini *et al.* (2003) y Szykowska-Czerniak *et al.* (2008) recomiendan utilizar diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante total de cualquier alimento.

A continuación se exponen los resultados obtenidos al aplicar los métodos ABTS, DPPH y FRAP a un extracto metanólico del aceite de argán, así como en la aplicación del método ABTS al aceite diluido directamente en n-hexano. Asimismo, la **Tabla 39** resume los resultados obtenidos a partir de los tres métodos, expresados como mmoles Trolox/Kg de aceite de argán.

**Tabla 39.**  
Capacidad antioxidante de las muestras de aceite de argán virgen evaluadas mediante los métodos ABTS, DPPH y FRAP.

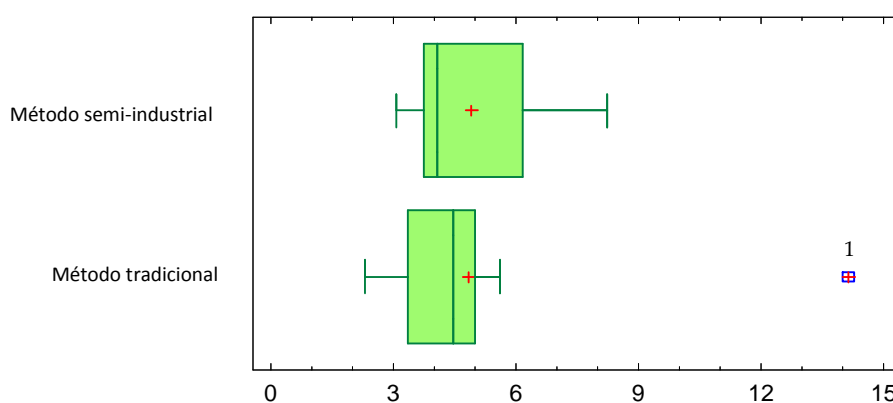
Muestra	Método ABTS		Método DPPH (extracto metanólico)	Método FRAP (extracto metanólico)
	Extracto metanólico	Aceite diluido n-hexano		
1	14,15±0,09	27,67±0,12	0,87±0,07	1,33±0,09
2	4,57±0,02	17,54±0,09	0,32±0,01	0,62±0,04
3	3,10±0,03	22,30±0,11	0,22±0,01	0,94±0,06
4	3,74±0,04	25,96±0,13	0,28±0,02	0,91±0,08
5	4,99±0,06	24,91±0,15	0,71±0,03	1,29±0,09
6	5,27±0,07	25,62±0,17	0,60±0,06	0,88±0,05
7	4,51±0,05	28,02±0,19	0,24±0,01	1,16±0,09
8	4,22±0,05	25,20±0,11	0,46±0,04	0,78±0,05
9	4,36±0,05	26,08±0,09	0,39±0,02	0,98±0,04
12	4,81±0,04	27,35±0,13	0,32±0,01	1,84±0,08
13	2,31±0,01	16,68±0,08	0,24±0,02	1,22±0,07
14	4,88±0,04	16,08±0,07	0,29±0,01	1,29±0,05
15	3,08±0,02	27,52±0,11	0,19±0,02	1,25±0,06
16	3,63±0,02	25,71±0,10	0,20±0,01	0,84±0,04
17	5,82±0,07	2,89±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02
19	8,23±0,09	23,42±0,10	0,42±0,01	2,32±0,05
20	7,83±0,06	25,33±0,12	0,58±0,02	2,20±0,08
21	3,98±0,04	23,93±0,11	0,40±0,01	0,74±0,06
22	4,14±0,02	14,16±0,12	0,28±0,03	0,89±0,07
23	3,85±0,01	16,21±0,09	0,28±0,01	0,75±0,06
24	5,60±0,03	14,26±0,08	0,31±0,01	0,97±0,09
25	2,48±0,01	17,88±0,08	0,53±0,05	0,93±0,08
26	3,34±0,01	20,32±0,10	0,23±0,01	1,14±0,08

### 6.3.1. Método ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)}

#### a. Capacidad antioxidante del extracto metanólico

Mediante este método, la capacidad antioxidante de los aceites de argán analizados, salvo la muestra nº 1 que presenta un valor anormalmente elevado (14,15 mmol Trolox/Kg), oscila entre 2,31-8,23 mmol Trolox/Kg, con un valor medio de 4,87 mmol Trolox/Kg de aceite. En el método de extracción tradicional, salvo la muestra nº 1, los valores obtenidos oscilan entre 2,31-5,60 mmol Trolox/Kg, mientras que en el método de extracción semi-industrial oscilan entre 3,08-8,23 Trolox/Kg. Como podemos observar en la **Figura 85**, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos de extracción del aceite testados en este estudio ( $p=0,256$  para el test de Cochran y  $p=0,297$  para el test de Bartlett).

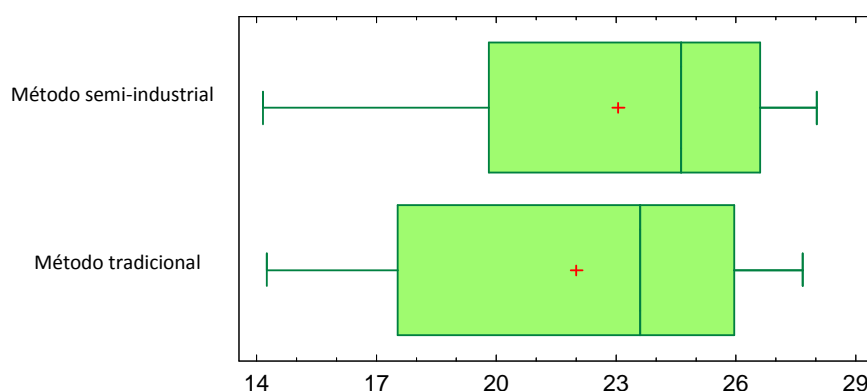
Gorinstein *et al.* (2003) aportan valores TEAC en aceites de oliva virgen que oscilan entre 0,78-2,64 mmol Trolox/Kg. Espín *et al.* (2000) resaltan que en la fracción metanólica o polar de los aceites vegetales se extraen principalmente los compuestos fenólicos. Brenes *et al.* (1999), Valavanidis *et al.* (2004) y Franconi *et al.* (2006) puntualizan que esta fracción contiene la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen (hidrotirosol, tirosol, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, etc.), lignanos y oleoeuropeína, entre otros compuestos.



**Figura 85.** Estudio comparativo de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/Kg aceite) de los extractos metanólicos de las muestras de aceite de argán obtenidas por métodos de extracción tradicional y semi-industrial determinados según método ABTS.

## b. Capacidad antioxidante del aceite diluido en n-hexano

La capacidad antioxidante de los aceites de argán analizados oscila entre 14,16-28,02 mmol Trolox/Kg, con un valor medio de 22,37 mmol Trolox/Kg de aceite. Comparando ambos métodos de extracción del aceite, para el método tradicional oscila entre 14,26-27,67 mmol Trolox/Kg, con un CV de 21,40% y para el método semi-industrial entre 14,16 y 28,02 mmol Trolox/Kg aceite, con un CV de 22,23%. Como podemos observar en la **Figura 86** tampoco existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de aceites ( $p=0,794$  para el test de Cochran y  $p=0,802$  para el test de Bartlett).



**Figura 86.** Estudio comparativo de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/Kg aceite) de las muestras de aceites diluidos con n-hexano obtenidas por métodos tradicional y semi-industrial determinados según método ABTS.

Los valores obtenidos tras aplicar el método ABTS al aceite diluido con n-hexano, muestran una mayor capacidad antioxidante total que en el caso del método ABTS aplicado al extracto metanólico. Esto puede ser debido a varias razones:

- la primera y quizás, más importante, que con n-hexano se efectúa una dilución del aceite y no un proceso de extracción, caso del metanol. Pellegrini *et al.* (2003) indica que al diluir el aceite en n-hexano se valora la contribución de todos los antioxidantes presentes (compuestos fenólicos, tocoferoles y carotenoides) a la capacidad antioxidante total. De acuerdo con esto, en el caso del aceite de argán, la aplicación del método ABTS al aceite diluido en n-hexano parece ser el procedimiento más adecuado.
- Otra razón, es la distinta reactividad de los compuestos antioxidantes en los dos medios utilizados, metanol y la mezcla n-hexano/etanol (Pellegrini *et al.* 2003).
- Tercera, en la dilución del aceite con n-hexano, pueden encontrarse además de tocoferoles y polifenoles como compuestos antioxidantes mayoritarios, escualeno

(Dessi *et al.* 2002) y algunos productos derivados de la reacción de Maillard, que se puede generar durante el proceso de tostado de la semilla de argán y que pueden presentar actividad antioxidante (Daglia *et al.* 2000; Pellegrini *et al.* 2003; Delgado-Andrade *et al.* 2005). Por ejemplo, de acuerdo con Daglia *et al.* (2000) y Pellegrini *et al.* (2003) durante el proceso de tostado del café, aunque parte de los compuestos polifenólicos se destruyen, también se generan compuestos derivados de la reacción de Maillard con propiedades antioxidantes, que contribuyen a la capacidad antioxidante total del producto. En este sentido, consideramos que podría ser interesante, en vistas a continuar esta línea de investigación sobre las propiedades antioxidantes del aceite de argán, profundizar en la identificación de estos compuestos.

En cuanto a datos recopilados en bibliografía, utilizando el método ABTS en aceites diluidos en n-hexano, Pellegrini *et al.* (2001) en un estudio llevado a cabo en Italia, obtienen valores TEAC comprendidos entre 1,53-2,69 mmol Trolox/Kg en aceite de oliva virgen extra y entre 0,72-1,06 mmol Trolox/Kg en aceite de oliva. En un estudio similar pero realizado posteriormente, estos mismos autores, aportan valores de capacidad antioxidante de 1,79 mmol Trolox/Kg en aceite de oliva virgen extra, de 0,63 mmol Trolox/Kg en aceite de oliva, de 1,29 mmol Trolox/Kg en aceite de maíz, de 2,20 mmol Trolox/Kg en aceite de soja, de 1,17 mmol Trolox/Kg en aceite de girasol y de 0,61 mmol Trolox/Kg en aceite de cacahuete (Pellegrini *et al.* 2003). Shahidi (2004) recuerda que el proceso de refinado afecta notablemente al contenido en antioxidantes de los aceites vegetales comestibles y por tanto, a su actividad biológica.

Romani *et al.* (1999) y Espín *et al.* (2000) resaltan la amplia variabilidad observada en la capacidad antioxidante total de los aceites de oliva virgen, hecho que atribuyen a diferencias derivadas de la variedad de aceituna, origen geográfico, climatología y proceso de extracción, entre otros factores. Samaniego *et al.* (2007) incluso observan variaciones entre campañas de recogida, en aceites de oliva virgen extra bien tipificados; así, obtienen un valor medio de 1,001 mmol Trolox/Kg aceite para la campaña 2003-2004, 0,852 mmol Trolox/Kg aceite para la campaña 2002-2003 y 0,557 mmol Trolox/Kg aceite para la campaña 2001-2002. En este estudio se correlaciona el contenido polifenólico total de los aceites con la capacidad antioxidante que presentan las muestras ( $n=39$ ,  $r=0,8927$ ). Otros autores como Velioglu *et al.* (1998), también comprueban esta correlación en distintos productos como verduras, hortalizas, frutas y semillas.

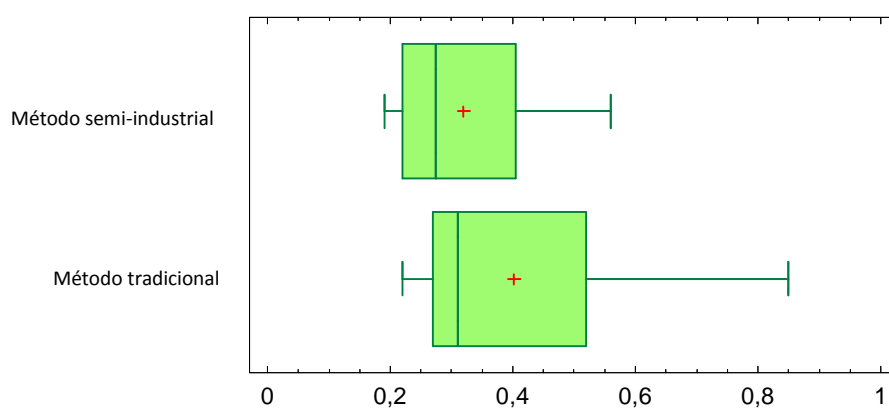
Por otra parte, Espin *et al.* (2000) y Valavanidis *et al.* (2004) resaltan al estudiar la capacidad antioxidante total en distintos aceites vegetales comestibles, la importancia no sólo del contenido total en tocoferoles, sino del isómero predominante debido a que la eficiencia como antioxidante varía en el orden  $\delta > \gamma \approx \beta > \alpha$ -tocoferol. Estos autores inciden en que el aceite de oliva virgen presenta concentraciones más bajas de tocoferoles totales que otros aceites como el de soja, y además, un 97% aproximadamente

del total corresponde a  $\alpha$ -tocoferol, con bajo poder antioxidante aunque es el isómero con mayor actividad como vitamina E.

Cabe destacar que en la amplia revisión bibliográfica realizada, no hemos encontrado ninguna referencia sobre la evaluación de la capacidad antioxidante en el aceite de argán.

### 6.3.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Al aplicar este método, se obtienen valores de capacidad antioxidante total que oscilan entre 0,19-0,85 mmol Trolox/Kg aceite de argán, con un valor medio de 0,37 mmol Trolox/Kg. En el método de extracción tradicional los valores obtenidos oscilan entre 0,22-0,85 mmol Trolox/Kg, mientras que en el método de extracción semi-industrial varían entre 0,19-0,56 mmol Trolox/Kg. No existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a capacidad antioxidante para un nivel de confianza del 95% entre ambos métodos de extracción ( $p=0,217$  para el test de Cochran y  $p=0,258$  para el test de Bartlett) como podemos observar en la **Figura 87**.



**Figura 87.** Estudio comparativo de la capacidad antioxidante (mmol Trolox/Kg aceite) de los extractos metanólicos de las muestras de aceites obtenidas por métodos de extracción tradicional y semi-industrial determinados según método DPPH.

El método DPPH aplicado a un extracto metanólico ha sido utilizado por muchos autores para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes alimentos (Villaño *et al.* 2005; Samaniego *et al.* 2007; Tuberoso *et al.* 2007; Michalska *et al.* 2007). En el caso concreto de aceites vegetales comestibles, Tuberoso *et al.* (2007) en un estudio realizado en diversos aceites de semillas y aceite de oliva, encuentran que los aceites que presentan mayor capacidad antioxidante son aceite de soja (0,41 mmol Trolox/L), aceite de oliva

(0,42 mmol Trolox/L) y aceite de maíz (0,45 mmol Trolox/L). Los aceites de semillas que muestran menor capacidad antioxidante son el de cacahuete (0,08 mmol Trolox/L), girasol (0,16 mmol Trolox/L), colza (0,25 mmol Trolox/L), semilla de uva (0,26 mmol Trolox/L) y lino (0,19 mmol Trolox/L).

Espín *et al.* (2000) en aceites vegetales comestibles procedentes de diversos países (Francia, Grecia, Italia, Marruecos, España, Turquía) comprueban que la actividad antioxidante varía en el orden: aceite de sésamo > colza > nuez ≈ oliva > lino. Asimismo, encuentran valores considerablemente inferiores en aceites de maíz, girasol, almendras, cacahuete, soja y avellana.

Samaniego *et al.* (2007) en un estudio comparativo de tres campañas de aceite de oliva virgen extra, encuentran que para la campaña 2003-2004 el valor TEAC medio es de 0,587 mmol Trolox/Kg; para la campaña 2002-2003 es de 0,204 mmol Trolox/Kg y para la campaña 2001-2002 de 0,249 mmol Trolox/Kg. Utilizando el mismo método de evaluación, otros autores recogen valores de capacidad antioxidante para aceites de oliva virgen extra entre 0,693-0,746 mmol Trolox/Kg (Gómez-Alonso *et al.* 2003).

Valavanidis *et al.* (2004) aplican el método DPPH a diferentes aceites vegetales comestibles separando previamente, la fase soluble en metanol y la fase lipídica que disuelven en acetato de etilo. Comprueban que la actividad antioxidante del extracto metanólico es proporcional al contenido en polifenoles del aceite. Por otra parte, la fracción lipídica contiene la mayor parte de los tocoferoles, triglicéridos y fosfolípidos; la capacidad antioxidante de esta fracción es debida principalmente, al tipo y concentración de tocoferoles, pero los fosfolípidos pueden afectar a la capacidad antioxidante de la vitamina E. Koga y Terao (1995) comprueban que los fosfolípidos incrementan la capacidad de la vitamina E para capturar y neutralizar radicales libres. Esto refuerza la idea de la complejidad que presenta la acción de los antioxidantes presentes en los alimentos, dado las numerosas interacciones que pueden tener lugar.

A raíz de los resultados obtenidos al aplicar el método DPPH a la fracción lipídica (disuelta en acetato de etilo), Valavanidis *et al.* (2004) atribuyen a su elevado contenido en  $\delta$ -tocoferol y en  $\gamma$ -tocoferol, aunque bajo en polifenoles (3-4 mg/Kg de aceite), el que el aceite de soja presente mayor actividad antioxidante que los aceites de maíz y girasol. Asimismo, comprueban la elevada capacidad antioxidante del aceite de oliva virgen debido a su elevado contenido en polifenoles totales, tirosol (0,5-0,7  $\mu$ g/Kg), hidroxitirosol (0,7-0,9  $\mu$ g/Kg), oleoeuropeína (40-60  $\mu$ g/Kg), escualeno (4200-4700 mg/Kg), y también tocoferoles, pero con un 90% en forma de  $\alpha$ -tocoferol.

### 6.3.3. Método FRAP

El método FRAP ha sido aplicado sólo a la fracción metanólica, ya que diversos autores como Pellegrini *et al.* (2003) señalan que no se puede aplicar directamente al aceite diluido en n-hexano. Las muestras analizadas de aceite de argán muestran valores de capacidad antioxidante que oscilan entre 0,62-2,32 mmol Trolox/Kg aceite, con un valor medio de 1,14 mmol Trolox/Kg. En el caso de los aceites extraídos mediante el método tradicional, los valores han oscilado entre 0,62-1,84 mmol Trolox/Kg, y en el método semi-industrial entre 0,75-2,32 mmol Trolox/Kg.

El método FRAP previa extracción con metanol, ha sido empleado por numerosos autores para evaluar la capacidad antioxidante en distintos alimentos como vino, té, cerveza, tomate o zumo de naranja, entre otros, obteniendo muy buenos resultados (Benzie y Strain, 1999; Fogliano *et al.* 1999; Benzie y Sztetto, 1999; Lee *et al.* 2000; Pulido *et al.* 2000). Sin embargo, son más escasos los trabajos publicados en los que se aplica el método a aceites vegetales comestibles. Manna *et al.* (2002) lo aplican en aceites de oliva vírgenes previa extracción con metanol para concentrar los polifenoles y encuentran una correlación estadísticamente significativa entre la capacidad antioxidante total del aceite y su contenido en o-difenoles. Los valores en las muestras analizadas (n=6) oscilan entre una capacidad antioxidante equivalente a una concentración  $200 \pm 10$  y  $1550 \pm 77$   $\mu\text{M}$ , expresado como Fe(II).

Cheung *et al.* (2007) utilizan el método FRAP para evaluar la capacidad antioxidante y la estabilidad de diversos aceites comestibles indicando que es un método rápido, de bajo coste y con un potencial redox de aproximadamente 0,70 V. Aplican el método al extracto metanólico y obtienen valores de 0,803 mmol/L en aceite de sésamo, 0,153 mmol/L en aceite de oliva, 0,108 mmol/L en aceite de girasol y 0,100 mmol/L en aceite de maíz, expresado como Fe(II). Utilizando un procedimiento idéntico al nuestro, Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008) aportan datos de 95,6-186  $\mu\text{mol Trolox}/100$  g en aceites de colza refinados y de 32,1-167  $\mu\text{mol Trolox}/100$  g en aceites de oliva, resaltando el contenido en polifenoles, esteroides, tocoferoles, flavonoides, etc. presentes en el aceite de colza, lo que se traduce en una elevada actividad antirradicales libres. En el aceite de colza sin refinar ("crudo") los valores de capacidad antioxidante alcanzan entre 284-552  $\mu\text{mol Trolox}/100$  g. Estos autores observan una correlación estadísticamente significativa entre la capacidad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos, pero no con el contenido total en tocoferoles; asimismo, indican que el proceso de refinado al que se somete el aceite de colza disminuye el contenido en polifenoles totales y su capacidad antioxidante entre un 60-80%. En aceites de oliva virgen extra procedentes de Italia y España, encuentran valores comprendidos entre  $61,6 \pm 2,01$  y  $167 \pm 1,69$   $\mu\text{mol Trolox}/100$  g de aceite.

Cabe señalar que los distintos autores no coinciden en la forma de expresar los resultados, apareciendo también en bibliografía como Trolox, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, etc. (Fogliano *et al.* 1999; Pulido *et al.* 2000), lo que dificulta la comparación entre los datos encontrados. Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008) inciden en la necesidad de comparar diferentes métodos para conseguir seleccionar el procedimiento más apropiado para la determinación de la capacidad antioxidante en cada tipo de muestras o asimismo, resaltan la escasez de trabajos publicados sobre cualquiera de los métodos en el caso concreto de los aceites vegetales comestibles.



## 7. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ACEITE DE ARGÁN EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE COLITIS *IN VIVO*

La búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal ha sido y es de gran interés para muchos investigadores. Aunque existen tratamientos efectivos para esta enfermedad (corticoides, salicilatos o azatioprina), los fármacos utilizados poseen una gran variedad de efectos secundarios adversos que limitan su aplicación. Este hecho es especialmente importante si consideramos la naturaleza crónica y recurrente de esta enfermedad. Los conceptos emergentes derivados de un conocimiento más profundo de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal, han propiciado la introducción de nuevos tratamientos farmacológicos como los antagonistas de citoquinas.

Al mismo tiempo, se ha desarrollado una estrategia paralela en el campo del tratamiento nutricional de la EII. Así, se ha demostrado que la fibra de la dieta puede atenuar la inflamación a través de su efecto prebiótico y que los probióticos pueden también ser efectivos como moduladores directos de la flora intestinal (Daddaoua, 2006, 2007; Perán, 2007). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ 2 y péptidos derivados de la leche de vaca poseen actividad antiinflamatoria a nivel intestinal (Oz, 2005; Daddaoua, 2005). Entre los factores nutricionales estudiados, los ácidos grasos, y concretamente los AGPI, ocupan un lugar importante.

Como hemos indicado anteriormente el objetivo de este apartado de la Tesis Doctoral ha sido estudiar el efecto antiinflamatorio del aceite de argán virgen y compararlo con el del aceite de oliva virgen extra y el de girasol. Con este fin hemos utilizado el modelo de inflamación en ratas inducido por la administración de TNBS.

### 7.1. Modelo del TNBS

Este modelo ha sido elegido por ser uno de los más utilizados tanto para la experimentación farmacológica como para estudios de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. El TNBS actúa como un hapteno modificando las proteínas de la mucosa intestinal lo que da lugar a una reacción inflamatoria que dura semanas. Esta reacción está caracterizada por una inflamación transmural de tipo Th-1 mediada por células CD4+, que cursa con fibrosis, infiltración de monocitos y macrófagos y alteraciones profundas de la secreción y la motilidad intestinal. Por tanto, la reacción que se produce en este modelo de inflamación es parecida a la enfermedad de Crohn (Kugathasan *et al.* 2007).

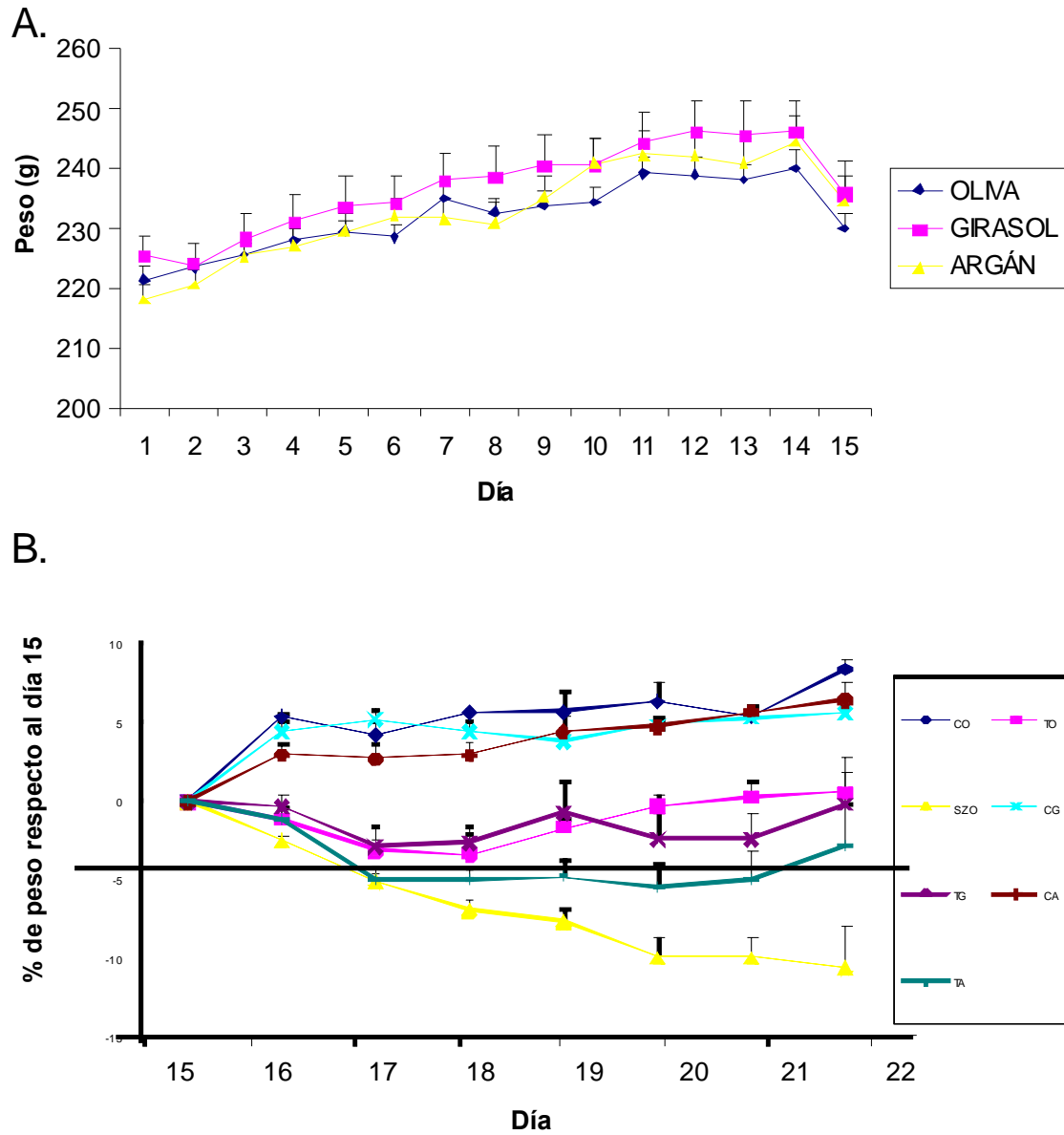
Como cabía esperar, nuestros resultados indican que la administración de TNBS produce anorexia e induce la pérdida de peso (**Figura 88**). Además, las ratas colíticas presentan un incremento en el índice de daño macroscópico como consecuencia de la presencia de erosiones en la mucosa, necrosis epitelial, fibrosis y edema. Por otra parte, la administración de TNBS produce un incremento en el peso del colon a la vez que disminuye su longitud y como consecuencia aumenta el peso por centímetro, lo que indica claramente la existencia de inflamación (**Tabla 40**).

<b>Tabla 40.</b>							
<b>Consumo de agua y comida e índices macroscópicos de los distintos grupos experimentales<sup>a</sup>.</b>							
	Consumo de agua (mL/rata·día)	Consumo de comida (mL/rata·día)	Longitud del daño (cm)	Índice de daño macroscópico	Peso del colon (g)	Longitud del colon (cm)	Peso/longitud (mg/cm)
CO	23,81±1,25	14,19±0,63	-	-	1,05±0,03	17,0±0,51	61,61±1,55
TO	34,26±2,72*	8,51±1,41*	1,91±0,51&	7,42±1,17	2,65±0,76*	14,90±0,47*	171,00±40,60*
SZO	17,98±2,64 <sup>#</sup>	3,45±0,56 <sup>#</sup>	0,95±0,41	7,50±0,61	1,38±0,19 <sup>#</sup>	14,28±0,32*	97,37±11,16
CG	19,71±2,19	13,07±0,99	-	-	1,01±0,08	16,17±1,01	63,05±6,15
TG	27,14±3,40*	7,24±1,02*	0,50±0,236 <sup>#</sup>	6,40±1,42	2,41±0,20*	14,60±0,54	163,90±31,79*
CA	21,19±2,23	14,71±0,88	-	-	0,95±0,04	16,50±0,76	57,59±3,79
TA	34,82±1,69*	6,81±1,02*	2,60±0,50&	8,13±1,11	2,35±0,31*	14,50±0,49*	168,23±30,65*

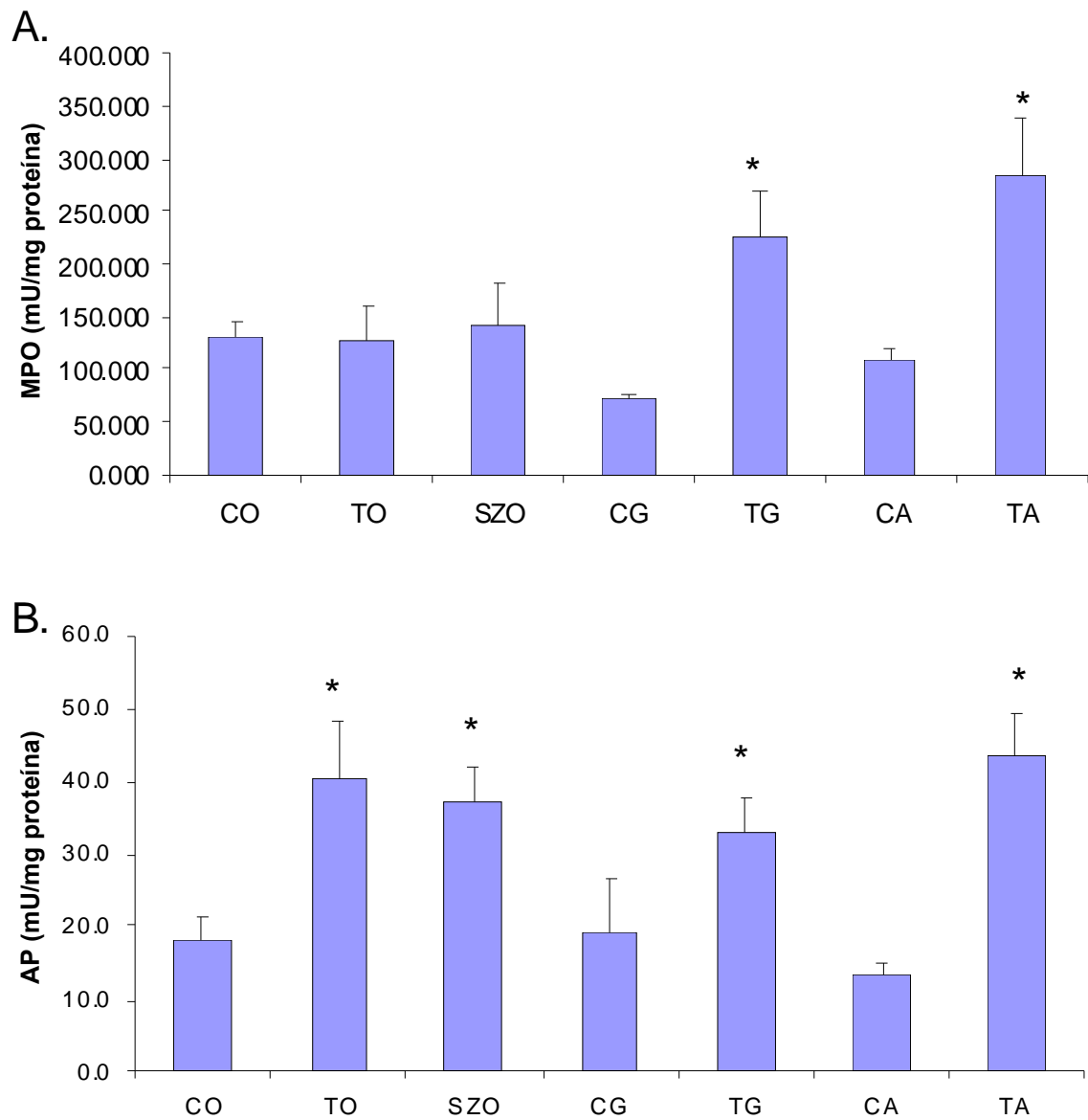
<sup>a</sup>Se representan las medias ± el S.E.M de cada grupo. C: control (n=3 en cada grupo), T: TNBS (n=6 en cada grupo), O: aceite de oliva virgen extra, G: aceite de girasol, A: aceite de argán, SZ: sulfasalazina (n=6). \* vs C, p<0,05; # vs TO, p<0,05; & vs TG p<0,05.

En cuanto a los parámetros bioquímicos, se observan incrementos en el colon de las ratas con colitis en las actividades mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina (**Figura 89**). La primera es una enzima marcadora de la infiltración de neutrófilos (Krawisz *et al.* 1984), mientras que la segunda ha sido descrita como marcador de inflamación intestinal en diversos modelos animales (Sánchez de Medina, 2004), siendo su incremento característico en la infiltración linfocitaria y en células de epitelio sometidas a estrés oxidativo.

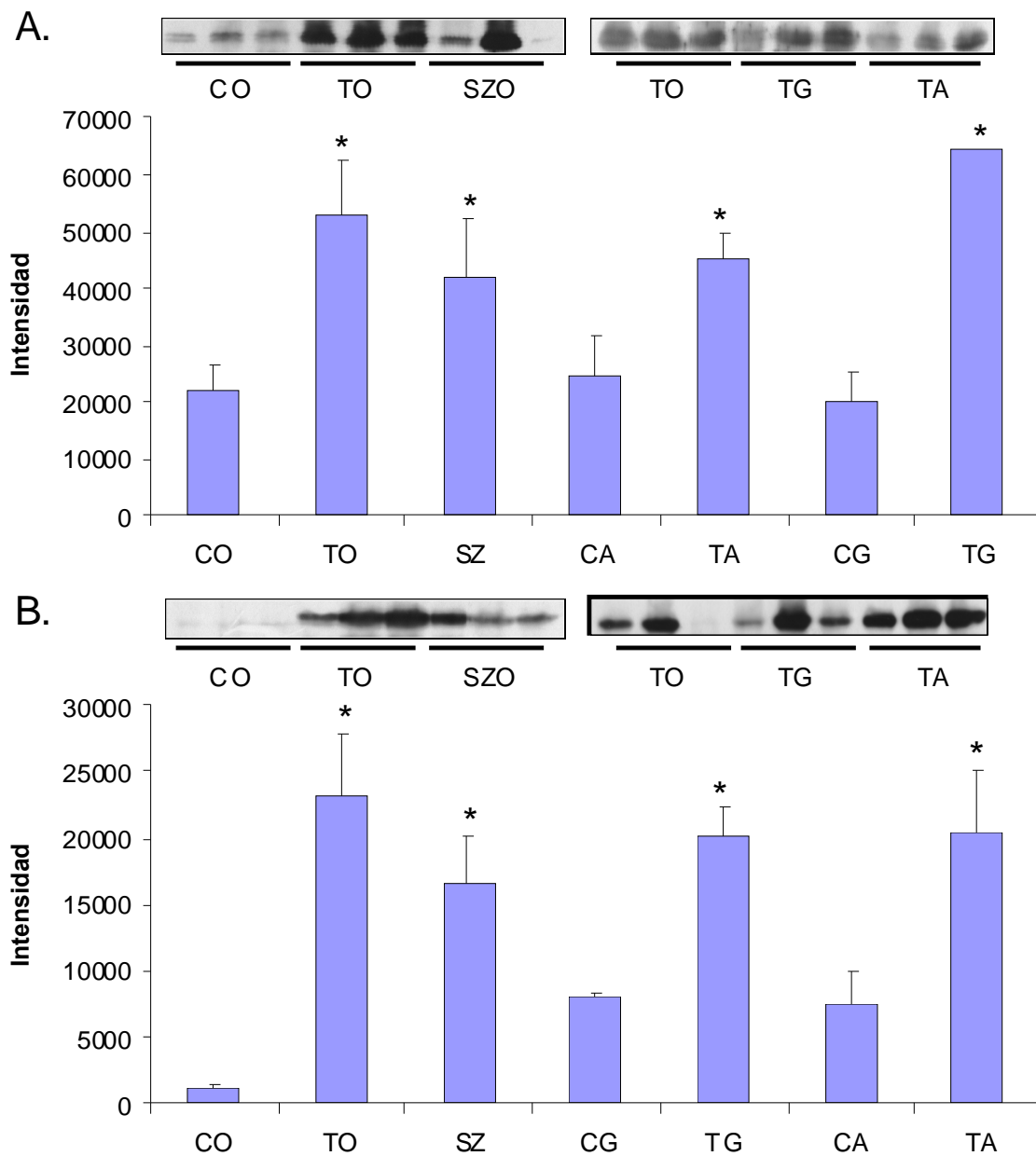
Además estudiamos la expresión de COX2 mediante *Western blot* (**Figura 90**). Esta es un enzima cuyos niveles de expresión son inducidos por la inflamación. Su papel es el de catalizar síntesis de eicosanoides que en general son mediadores de la inflamación (Smith, 2008). Tal y como se ha descrito ampliamente, la colitis induce un incremento en la expresión de esta enzima (Krawisz *et al.* 1984).



**Figura 88.** Peso de los distintos grupos experimentales antes (A.) y después (B.) de la inducción de la colitis. C: control (n=3 en cada grupo), T: TNBS (n=6 en cada grupo), O: aceite de oliva virgen extra, G: aceite de girasol, A: aceite de argán, SZ: sulfasalazina (n=6). En ambas gráficas se representan las medias  $\pm$  S.E.M. de cada grupo. Todos los grupos T difieren de los grupos C a todos los tiempos. El grupo SZO difiere del grupo CO a todos los tiempos y del TO a partir del día 18,  $p < 0,05$ .



**Figura 89.** Actividades mieloperoxidasa (A.) y fosfatasa alcalina (B.) colónicas de los distintos grupos experimentales. Se representan las medias  $\pm$  el S.E.M. de cada grupo. C: control (n=3 en cada grupo), T: TNBS (n=6 en cada grupo), O: aceite de oliva virgen extra, G: aceite de girasol, A: aceite de argán, SZ: sulfasalazina (n=6). \*vs C,  $p < 0,05$ .

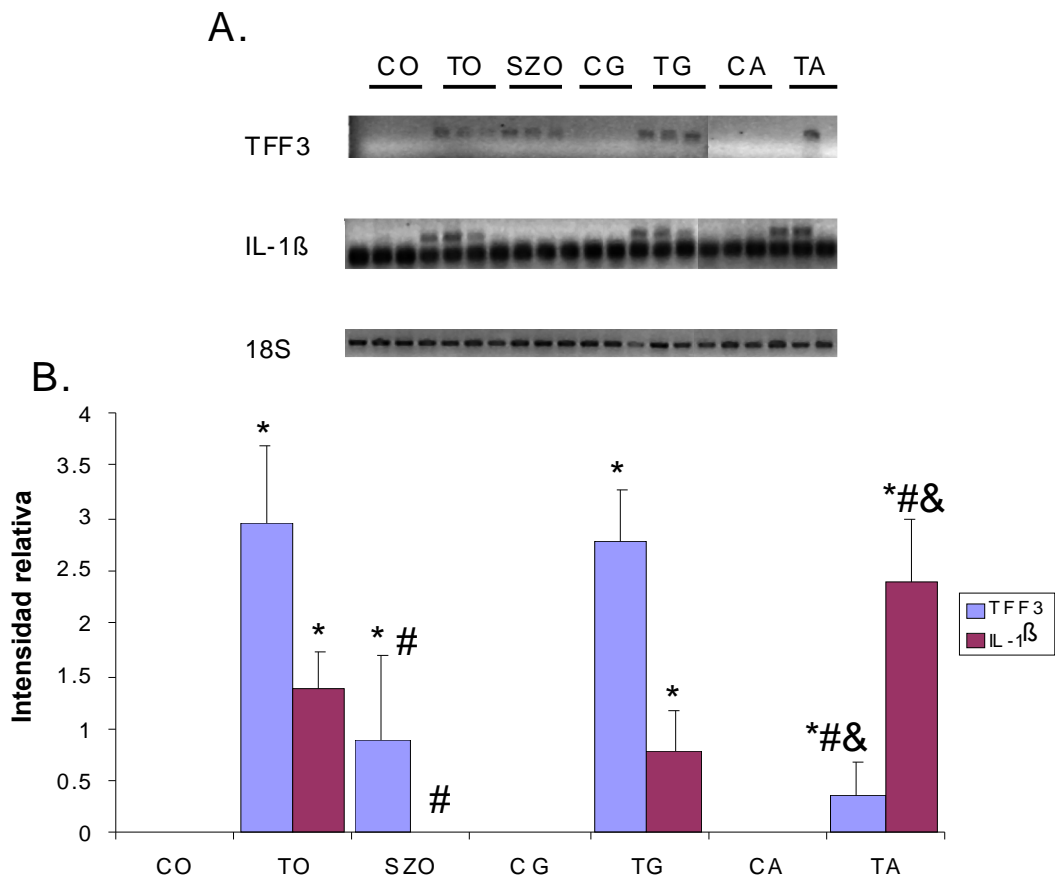


**Figura 90.** Expresión colónica de FoxP3 (A.) y de COX-2 (B.) determinada por Western blot en los distintos grupos. Se muestran geles representativos de cada medida además de las medias  $\pm$  el S.E.M. de las densitometrías. C: control (n=3 en cada grupo), T: TNBS (n=6 en cada grupo), O: aceite de oliva virgen extra, G: aceite de girasol, A: aceite de argán, SZ: sulfasalazina (n=6). \*vs C,  $p < 0,05$ .

Desde el punto de vista inmunológico, la inflamación se traduce en un incremento de los niveles de RNA mensajero de IL-1 $\beta$  (**Figura 91**). La IL-1 $\beta$  es una citoquina mediadora de la inflamación con efectos tanto a nivel sistémico (fiebre o anorexia) como local. Esta citoquina es producida por distintos tipos de células (macrófagos, monocitos y células dendríticas) y regula la actividad de células T. Entre sus múltiples efectos la IL-1 $\beta$  induce la producción de COX-2 que a su vez induce la síntesis de prostaglandinas y

prostaciclina que como consecuencia inducen dolor, fiebre y anorexia. Por otra parte, la inflamación incrementa los niveles de FoxP3 (**Figura 90**), un marcador de diferenciación de células T reguladoras, indicando que como parte del proceso inflamatorio se produce un incremento en el número o en la función de este tipo de células. La conversión de células T vírgenes a células T reguladoras se produce en el timo y en tejidos periféricos y se cree que su papel puede ser protector, limitando la respuesta inflamatoria/inmune (Izcue *et al.* 2006).

Por último se determinan mediante RT-PCR los niveles de expresión de TFF-3 (**Figura 91**), un péptido implicado en procesos de proliferación y reparación intestinal. Como cabía esperar, estos niveles se encuentran incrementados en las ratas colíticas, indicando la existencia de una reacción epitelial con el fin de sanar las heridas (Podolsky, 2000).



**Figura 91.** Expresión colónica de mRNA de TFF3 e IL-1 $\beta$  determinadas por RT-PCR en los distintos grupos. Se ha utilizado la subunidad 18S del RNA como control de carga. Se muestran geles representativos de cada medida (A.) además de las medias  $\pm$  el S.E.M. de las densitometrías (B.). C: control (n=3 en cada grupo), T: TNBS (n=6 en cada grupo), O: aceite de oliva virgen extra, G: aceite de girasol, A: aceite de argán, SZ: sulfasalazina (n=6). \*vs C,  $p < 0,05$ ; # vs TO,  $p < 0,05$ ; & vs TG,  $p < 0,05$ .

## 7.2. Efecto antiinflamatorio a nivel intestinal de la administración de aceite de argán virgen en la dieta de ratas, en comparación con la administración de aceites de oliva virgen extra y girasol

Se admite que tanto los ácidos grasos de la serie  $n-3$  como el ácido oleico (18:1  $n9$ ) poseen actividad antiinflamatoria. De hecho, se recomienda la suplementación de dietas destinadas a la alimentación de pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal con ácidos grasos de la serie  $n-3$ . No obstante, en animales de experimentación se ha observado que éstos podrían afectar a la defensa antioxidante, promoviendo el daño oxidativo (Nieto *et al.* 1998). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la administración de dietas que contienen toda o parte de su grasa, en forma de aceite de oliva son efectivas en la reducción de la inflamación intestinal en modelos animales (Camuesco *et al.* 2005). Por último, en modelos animales de experimentación se ha demostrado que el efecto antiinflamatorio se potencia cuando se administra aceite de oliva en combinación con aceite de pescado o con ácidos grasos de la serie  $n-3$ , DHA y EPA (Alzoughaibi *et al.* 2003).

En general se asume que una baja relación entre el contenido en ácidos grasos de la serie  $n-6$  y de la serie  $n-3$  es beneficiosa en el tratamiento de diversas enfermedades y que dietas ricas en ácidos grasos de la serie  $n-6$  son perjudiciales en la inflamación. Esta creencia parte del hecho de que el ácido linoleico (18:2  $n-6$ ), el ácido graso de la serie  $n-6$  más abundante de la dieta, se metaboliza en distintos tejidos, dando como resultado la producción de ácido araquidónico.

No obstante, no existen muchos estudios que hayan abordado directamente el papel de los AGPI  $n-6$  en la inflamación intestinal; algunos evidencian que su ingesta podría no ser perjudicial sino beneficiosa en comparación por ejemplo, con la administración de ácido oleico. Así, un estudio europeo llevado a cabo en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal indica que la administración de AGPI  $n-6$  podría ser más beneficiosa que la de AGMI (oleico) ya que induce mayores índices de remisión en los pacientes (Gassull *et al.* 2002). Por otra parte, estudios recientes han indicado que la suplementación de la dieta de animales de experimentación con ácido araquidónico, no produce agravamiento de la inflamación sino que podría incluso, ser beneficiosa en modelos de inflamación intestinal (Roy *et al.* 2007; Ramakers *et al.* 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, planteamos este estudio con el objeto de dilucidar el efecto del aceite de argán en la inflamación intestinal y comparar los efectos antiinflamatorios de tres aceites: aceite de oliva virgen extra (alto contenido en AGMI, bajo contenido en ácidos grasos  $n-6$ ), aceite de argán (contenido medio en AGMI, contenido medio en ácidos grasos  $n-6$ ) y aceite de girasol (bajo contenido en AGMI, alto contenido en ácidos grasos  $n-6$ ).

Hemos utilizado la sulfasalazina como tratamiento antiinflamatorio de referencia o control. Este es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los animales tratados con este fármaco fueron alimentados con la dieta que contiene aceite de oliva virgen extra por ser de los tres aceites, el más estudiado y conocido.

En general, nuestros resultados muestran que los tres tipos de aceite poseen efectos muy similares. De hecho, la dieta no induce diferencias en cuanto a la ingesta de agua o comida, ni en cuanto al peso corporal, aunque, como ya hemos comentado (**Figura 88**), sí se encuentran diferencias en cuanto a la ingesta de comida y el peso entre las ratas controles y las ratas con colitis. Por otra parte, las ratas tratadas con sulfasalazina experimentan un descenso de peso significativamente mayor que el de las ratas colíticas alimentadas con la misma dieta. El hecho de que la sulfasalazina induce la pérdida de peso en el modelo de colitis inducida por TNBS ha sido previamente documentado (Daddaoua *et al.* 2005; 2006; 2007).

En cuanto a los parámetros macroscópicos, sólo la extensión del daño es significativamente menor en las ratas alimentadas con aceite de girasol que en las alimentadas con aceite de argán u oliva virgen extra, mientras que no se observan diferencias en cuanto a índice de daño macroscópico, peso de colon, longitud o relación peso/longitud (**Tabla 40**). Por otro lado y como se esperaba, la administración de sulfasalazina induce la normalización del peso del colon y de la relación peso/longitud, indicando una menor inflamación, mientras que se mantiene el acortamiento colónico consecuencia presumiblemente, de la presencia de fibrosis. Estos resultados coinciden con resultados previos (Daddaoua, 2007) en los que se observa que la sulfasalazina no corrige este último parámetro.

Las determinaciones bioquímicas e inmunológicas confirman la tendencia de las observaciones macroscópicas, prácticamente en todos los casos. Así, la inducción de colitis produce un incremento en la actividad fosfatasa alcalina, así como en la expresión de COX2 y FoxP3 independientemente de la dieta administrada. La administración de sulfasalazina no modifica ninguno de estos parámetros.

Por otra parte, la actividad MPO se incrementa en el caso de las ratas colíticas alimentadas con aceite de girasol y argán, mientras que las ratas colíticas que reciben la dieta con aceite de oliva virgen extra y las que reciben sulfasalazina, muestran valores de actividad MPO normalizados con respecto al control. En este sentido, nuestros resultados coinciden con los de un estudio llevado a cabo por Nieto *et al.* (2002) en el que se describe que el aceite de oliva produce una disminución en la actividad MPO, y no en la actividad fosfatasa alcalina en ratas colíticas. En este estudio se comparan estos valores con los de ratas alimentadas con otra dieta con un perfil lipídico muy similar, pero cuya



grasa procede en parte, de fosfolípidos de cerebro de cerdo. Los autores indican que el efecto observado podría ser debido al alto contenido en antioxidantes (ácidos fenólicos y tocoferoles) en el aceite de oliva virgen.

Aunque en nuestro estudio no se observan diferencias en los valores de COX2 de los distintos grupos de TNBS (**Figura 90**), varios estudios indican que la administración de aceite de oliva disminuye la actividad COX2 y su expresión. Así, en un estudio llevado a cabo en el modelo de ratones *knock out* de IL-10 se ha descrito que la administración de aceite de oliva inhibe la expresión de COX2 en comparación con la administración de aceite de pescado o de aceite de maíz (Hegazi *et al.* 2006). En este estudio se observa también que el aceite de maíz y de oliva produce una menor incidencia de colitis severa y en el índice de colitis en comparación con la administración de aceite de pescado. Es más, estudios recientes en células de intestino humano y macrófagos han demostrado que extractos polifenólicos y diversos polifenoles del aceite de oliva virgen pueden inhibir específicamente la expresión de la COX2 y por tanto, la formación de eicosanoides (Maiuri *et al.* 2005). Nuestros resultados no contradicen los de estos estudios ya que en nuestro caso, no incluimos aceite de pescado y los demás aceites estudiados contienen también polifenoles que podrían ejercer la misma acción, lo que es coherente con la ausencia de diferencias en este sentido.

Por otra parte, se observan valores incrementados de IL-1 $\beta$  en todos los grupos de colitis, independientemente de la dieta que reciben, aunque en este caso, la administración de aceite de argán produce un incremento significativamente mayor que los otros aceites. Una vez más, la administración de sulfasalazina tiene como consecuencia la disminución de los valores de estos parámetros, indicando su efectividad en el tratamiento de la enfermedad. Como se ha comentado anteriormente, monocitos, macrófagos y células dendríticas son los principales productores de IL-1 $\beta$ . Wallace *et al.* (2005) llevan a cabo un estudio en el que se caracteriza el efecto de la administración de distintos aceites en la dieta de ratones sobre la producción de citoquinas por macrófagos inflamatorios. Estos autores observan que el aceite de pescado inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1 $\beta$ ) y de PGE2 con respecto a los demás aceites estudiados: aceite de coco (rico en ácidos grasos saturados), aceite de oliva (rico en ácido oleico) y aceite de cártamo (rico en ácido linoleico), pero no observan diferencias significativas entre estos aceites. Nuestros resultados coinciden con los de estos autores ya que indican que la producción de IL-1 $\beta$  es independiente del contenido en ácidos grasos de la serie *n-6* y de ácidos grasos monoinsaturados.

Por último, la expresión de TFF-3 es menor en el grupo de ratas alimentadas con aceite de argán y en las ratas tratadas con sulfasalazina, que en los otros dos grupos de colitis (**Figura 91**). Los resultados obtenidos con la sulfasalazina coinciden con los obtenidos en otros estudios (Daddaoua, 2005; Daddaoua, 2006).

En general, los resultados obtenidos indican que no existe una relación entre el contenido en ácidos grasos de la serie *n*-6 de la dieta y grado de inflamación en ratas con colitis inducida por la administración de TNBS. Estos resultados refuerzan estudios recientes (Roy *et al.* 2007; Ramakers *et al.* 2008) que indican que los ácidos grasos de la serie *n*-6, en contra de lo que se ha mantenido durante muchos años, no producen un agravamiento de la inflamación intestinal.

Además, y aunque es necesario profundizar en estos estudios, los resultados obtenidos hasta el momento, indican que el aceite de argán puede ejercer un efecto beneficioso similar al del aceite de oliva virgen en el tratamiento de enfermos con inflamación intestinal, siempre que se utilice en dietas adicionadas de ácidos grasos de la serie *n*-3.



## **VI. CONCLUSIONES**



En base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el desarrollo del plan de trabajo, podemos inferir las siguientes conclusiones:

#### **PRIMERA:**

Los parámetros de calidad (grado de acidez, índice de peróxidos,  $K_{270}$ ,  $K_{232}$ , humedad e impurezas volátiles, e impurezas insolubles en éter de petróleo) muestran una amplia variabilidad en los 26 aceites de argán analizados. En función de estos, sólo 5 alcanzan la categoría de aceite de argán virgen extra establecida en la Norma Marroquí vigente, mientras que 11 corresponden a virgen lampante, siendo grado de acidez y  $K_{270}$  los parámetros más determinantes. Los valores de índice de refracción y ceras se encuentran en el rango establecido en la legislación.

#### **SEGUNDA:**

La presencia de Cu supera el límite reglamentado de 0,1 mg/Kg en todos los aceites analizados, con valores suficientes para producir un notable efecto catalítico en el proceso de autooxidación. Asimismo, en 2 aceites se supera el límite de Fe (3,0 mg/Kg) y en 5 el límite de Pb (0,1 mg/Kg). Los niveles de Cr y Mn son similares e incluso inferiores, a los encontrados en bibliografía para otros aceites vegetales comestibles.

#### **TERCERA:**

El tratamiento estadístico de los datos demuestra una amplia variabilidad en todos los parámetros de calidad evaluados, independientemente del método de extracción del aceite, apareciendo incluso, valores estadísticamente anómalos. Al margen de esta variabilidad, se observa una notable disminución de la calidad en los aceites procedentes del método de extracción tradicional, frente al semi-industrial o parcialmente mecanizado.

#### **CUARTA:**

En el perfil en ácidos grasos del aceite de argán, destaca su contenido en ácido oleico, que oscila entre un 37 y un 48%. El contenido en ácido linoléico varía entre un 31 y un 40%. Los ácidos grasos saturados más característicos son palmítico y esteárico, oscilando entre un 12 y 14% y entre un 5 y 8%, respectivamente. Esto se traduce en un 45% de ácidos grasos monoinsaturados, 35% de poliinsaturados y un 20% de saturados.

#### QUINTA:

El contenido en polifenoles totales oscila entre 3,96 y 152,04 mg/Kg, expresado en ácido gálico y el de tocoferoles se sitúa entre 427,0 y 654,0 mg/Kg, siendo el  $\gamma$ -tocoferol el isómero mayoritario (aproximadamente un 85% del total). Estos valores demuestran que la presencia de antioxidantes en este aceite es bastante elevada, lo que no sólo va a repercutir positivamente en sus efectos biológicos sino también en su estabilidad.

#### SEXTA:

Los valores de capacidad antioxidante total del extracto metanólico del aceite de argán, aplicando los métodos ABTS y DPPH resultan similares e incluso superiores a los encontrados en bibliografía para aceite de oliva virgen y aceites de colza, soja, cacahuete y girasol; aplicando el método FRAP, similares a aceite de oliva virgen pero inferiores a aceite de colza. Por otra parte, el método ABTS en el aceite de argán diluido en n-hexano, aporta valores TEAC superiores a los indicados por otros autores, para aceite de oliva virgen y otros aceites vegetales comestibles.

#### SÉPTIMA:

El modelo experimental de colitis *in vivo* muestra que el efecto antiinflamatorio de la administración en la dieta de aceite de argán es similar al del aceite de oliva virgen. Aunque es necesario profundizar en estos estudios, los resultados preliminares indican que el aceite de argán podría ser utilizado en dietas destinadas a enfermos con enfermedad inflamatoria intestinal, siempre que éstas presenten un contenido adecuado en ácidos grasos de la serie *n-3*.

#### OCTAVA:

Todo lo expuesto en relación a contenido en polifenoles y tocoferoles, capacidad antioxidante total, perfil en ácidos grasos, así como los efectos beneficiosos mostrados en la enfermedad inflamatoria intestinal y otros constatados en bibliografía, corroboran el interés nutricional y el potencial del aceite de argán como ingrediente funcional. Sin embargo, los resultados de este estudio también indican que es imprescindible estandarizar, controlar y mejorar el proceso de extracción, a fin de incrementar la calidad de este peculiar aceite.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





- Ahn D, Sell M, Jeffery C, Jo W, Chen C, Wu C, Lee J. Dietary vitamin E affects lipid oxidation and total volatiles of irradiated raw turkey meat. *Food Sci.* 1997; 62: 5 - 10.
- Alaoui A, Charrouf Z, Soufiaoui M, Carbone V, Malorni A, Pizza C. Triterpenoid saponins from the shells of *Argania spinosa* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 4600 - 3.
- Aleman M. Enciclopedia de las Dietas y la Nutrición. Planeta. Barcelona, 1995.
- Alcolea JF, Cano A, Acosta M. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of grapes. *Nahrung* 2002; 46: 353 - 6.
- Aldini G, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31 (9): 1043 - 50.
- Almero JM. Modelos experimentales *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal: Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr. Hosp.* 2007; 22(2): 178 - 89.
- Alonso AM, Dominguez CC, Guillén DA, Barroso CG. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3112 - 5.
- Alounai M, Bani-Aameur F. Effect of light on germination of Argan {*Argania spinosa* (L.) Skeels} seeds. *Acta Botanica Gallica* 2003; 150(1): 59 - 64.
- Alzoghaibi MA, Walsh SW, Willey A, Fowler AA, Graham MF. Linoleic acid, but not oleic acid, upregulates the production of interleukin-8 by human intestinal smooth muscle cells isolated from patients with Crohn's disease. *Clin. Nutr.* 2003; 22(6): 529 - 35.
- Andoh A, Tsujikawa T, Ishizuka I, Araki Y, Sasaki M, Koyama S, Fujiyama Y. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int. J. Mol. Med.* 2003; 12(5): 721 - 5.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002; 127: 183 - 98.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Method of Analysis. Helrich K. (Ed.). Arlington, 1990.

AOCS (American Oil Chemistry Society). Sampling and analysis of commercial fats and oils: Determination of copper, iron and nickel by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry. *AOCS Official Methods* 1992; 18b: 91.

Aparicio R, Harwood J. Manual del Aceite de Oliva. Mundi-Prensa - AMV Ediciones. Madrid, 2003.

Aranda R, Sydora BC, Mcallister PL, Binder SW, Yang HT, Targan SR, Kronenberg M. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4<sup>+</sup>, CD45RB<sup>high</sup> T cells to SCID recipients. *J. Immunol.* 1997; 158: 3464 - 73.

Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immunol.* 1993; 54: 167-227.

Argan Oil {sede WEB}. {Acceso 30 de mayo de 2005}. Disponible en: <http://www.dietobio.com/aliments/en/argan.html>.

Argan Oil Company. {Acceso 6 de febrero de 2006}. Disponible en: <http://www.arganoilco.com>.

Arisawa M, Kinghorn AD, Cordell GA, Phoebe CH, Fansworth NR. Plants anticancer agents XXXVI: schottenol glucoside from *Baccharis cordofolia* and *ippomopsis agrretgatta*. *Planta Médica* 1985; 6: 544 - 5.

Arts MJ, Dallinga JS, Voss HP, Haenen GR, Bast A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* 2004, 88: 567 - 70.

Aust O, Sies H, Stahl W, Polidori MC. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J. Chromatogr. A.* 2001; 936: 83 - 93.

Awad AB, Fink CS. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J. Nutr.* 2000; 130: 2127 - 30.

Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79: 969 - 73.

Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem.* 2008; 108: 1122 - 32.

Ballester I, Daddaoua A, López-Posadas A, Nieto A, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, Sánchez de Medina, F. The bisphosphonate alendronate improves the

- damage associated with trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *British J. Pharmacol.* 2007; 151: 206 - 15.
- Bani-Aameur F, Sipple-Michmerhuizen J. Germination and seedling survival of argan (*Argania spinosa*) under experimental saline conditions. *J. Arid Environ.* 2001; 49: 533 - 40.
- Bartram HP, Gostner A, Reddy BS. Missing anti-proliferative effect of fish oil on rectal epithelium in healthy volunteers consuming a high-fat diet: potential role of the *n-3:n-6* fatty acid ratio. *Eur. J. Cancer Prev.* 1995; 4: 231 - 7.
- Belyazid S. Achieving sustainability in the Argane Forest, Morocco. *Master's Thesis*. Lund University Master's Program in Environmental Sciences (LUMES). Lund, Sweden, 2000.
- Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves. *Food Chem.* 2000; 68: 457 - 62.
- Bendini A, Cerretani L, Vecchi S, Carrasco-Pancorbo A, Lercker G. Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 4880 - 7.
- Benincasa Z, Lewis J, Perri E, Sindona G, Tagarelli A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Anal. Chim. Acta* 2007; 585: 366 - 70.
- Benjelloun B, Talou T, Delmas M, Gaset A. Oxidation of rapessed oil: effect of metal traces. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991, 68: 210 - 1.
- Bennani H, Drissi A, Giton F, Kheuang L, Fiet J, Adlouni A. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect. Prev.* 2007; 31 (1): 64 - 9.
- Benzaria A, Meskini N, Dubois M, Croset M, Némoz G, Lagarde M, Prigent AF. Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nutrition* 2006; 22: 628 - 37.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996; 239: 70 - 6.
- Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzimol.* 1999; 299: 15 - 27.

Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 633 - 6.

Berrada Y, Settaf A, Baddouri K, Cherrah A, Hassar M. Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan, *Argania sideroxydon*. *Therapie* 2000; 55: 375 - 8.

Berrougui H, Ettaib A, Herrera MD, Álvarez M, Bennani-Kabchi N, Hmamouchi M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones Shawi rats. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 89: 15 - 8.

Berrougui H, Álvarez M, Pérez C, Ettaib A, Hmamouchi M, Marhuenda E, Herrera MD. Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *British J. Nutr.* 2004; 92 (6): 921 - 9.

Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Khalil A. Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006; 184: 389 - 96.

Bertran X, Mane J, Fernández BF *et al.* Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 1996; 38: 899 - 904.

Blekas G, Psomiadou E, Tsimiadou M, Boskou D. On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104: 340 - 6.

Botsoglou N, Fletouris D, Psomas J, Mantis A. Rapid gas chromatographic method for simultaneous determination of cholesterol and alpha-tocopherol in eggs. *J. AOAC Int.* 1998; 81(6): 1177 - 83.

Botta G. Influencia de los revestimientos en la calidad del aceite. *Alimentación: Equipos y Tecnología* 1990; 6: 61 - 4.

Bousselmame F, Kenny L, Chlyah H. Optimisation des conditions de cultura pour l'enracinement *in vitro* de l'arganier (*Argania spinosa* L.). *Life Sci.* 2001; 324: 995 - 1000.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technol.* 1995; 28: 25 - 30.

Brash DE, Howre PA. New careers for antioxidants. *PNAS.* 2002; 99: 13969 - 71.

- Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2 and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993; 78: 127 - 31.
- Brenes M, García A, García P, Ríos JJ, Garrido A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 3535 - 40.
- Brullet E, Bonfill X, Urrutia G, Ruiz-Ochoa V, Cueto M, Clofent J, Martínez JF, Riera J, Obrador A. Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas: Spanish group on the epidemiological study of inflammatory bowel disease. *Med. Clin. (Barc.)* 1998; 110: 651 - 6.
- Caballero B, Trugo LC, Flinglas PM. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press. Oxford, 2003.
- Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Lead and cadmium contamination in dairy products and its repercussion on total dietary intake. *J. Agric. Food Chem.* 1995a; 43, 1605 - 9.
- Cabrera C, López MC, Gallego C, Lorenzo ML, Lillo E. Lead contamination levels in potable, irrigation and waste waters from an industrial area in southern Spain. *Sci. Total Environ.* 1995b; 159: 17 - 21.
- Cabrera C, Giménez R, López MC. Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 4427 - 35.
- Cabrera C, Gallego C, López MC, Lorenzo ML, Lillo E. Determination of levels of lead contamination in food and feed crops. *J. AOAC Int.* 1994; 77: 1249 - 52.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea – A review. *J. Am. Coll. Nutr.* 2006; 25(2): 79 - 99.
- Calapaj R, Chiricosta S, Salia G, Bruno E. Determinazione di metalli in tracce in oli vegetali. Atti de XII Congresso Nazionale di Merceologia. Torino, 1986.
- Campbell S, Stone W, Whaley S, Krishnan K. Development of gamma ( $\gamma$ )-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2003; 47: 249 - 59.
- Camuesco D, Gálvez J, Nieto A, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Concha A, Xaus J, Zarzuelo A. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (*n*-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *J. Nutr.* 2005; 135(4): 687 - 94.

Cano A, Hernandez-Ruiz J, García-Cánovas F, Acosta M, Arnao MB. End-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* 1998; 196 - 200.

Capriflavors {sede Web}. {acceso 28 de agosto de 2006}. Disponible en : <http://www.capriflavors.com/argan.php>.

Castelluccio C, Bolwell GP, Gerrish C, Rice-Evans C. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem. J.* 1996; 316: 691 - 4.

Castillo JR, Jiménez MS, Ebdon L. Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization. *J. Anal. At. Spectrom.* 1999; 14: 1515 - 8.

Charrouf M. Contribution à l'étude chimique de l'huile d'*Argania spinosa* (Sapotacées). Ph. D. Thesis, University of Perpignan. Perpignan, France, 1984.

Charrouf Z. Valorisation des produits de l'arganier. *Actes des journées d'étude sur l'arganier*. Essaouira, 1995.

Charrouf Z, Guillaume D. Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels: a review. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 67: 7 - 14.

Charrouf Z, El Hamchi H, Mallia S, Licitra G, Guillaume D. Influence of roasting and seed collection on argan oil odorant composition. *Natural Product Communications* 2006; 1(5): 399 - 3.

Chaussod R, Adlouni A, Christon R. The argan tree and argan oil in Morocco: towards a deep change in a traditional agroforestry system: economic and scientific challenges. *Cahiers d'Études et de Recherches Francophones* 2005; 14(4), 351 - 6.

Cheftel LC, Cheftel H. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Acribia. Zaragoza, 1992.

Chen C, Shah YM, Morimura K, Krausz KW, Miyazaki M, Richardson TA, Morgan ET, Ntambi JM, Idle JR, González FJ. Metabolomics reveals that hepatic stearyl-CoA desaturase 1 downregulation exacerbates inflammation and acute colitis. *Cell Metab.* 2008; 7(2): 135 - 47.

Chen CY, Milbury PE, Kwak HK. Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J. Nutr.* 2004; 134: 1459 - 66.

Cherbut C, Michel C, Lecannu G. The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J. Nutr.* 2003; 133: 21 - 7.

Cherki M, Drissi A, Derouiche A, El Messal M, Barnou Y, Idrissi-Oudghiri A, Khalil A, Adlouni A. Influence of argan oil administration on lipid peroxidation and paraoxonase activities in healthy Moroccan men. *Poster Session Nutrition*. Rabat, 2003.

Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, Khalil A, Adlouni A. Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2005; 15(5): 352 - 60.

Cherki M, Berrougui H, Drissi A, Adlouni A, Khalil A. Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases?. *Pharmac. Res.* 2006; 54(1): 1 - 5.

Chimi H, Rahmani M, Cillard P. Etude de la fraction phenolique des huiles d'olives vierges et d'argan du Marocain. *Actes Inst. Agronom. Vet.* 1988; 8: 17 - 21.

Ching SMC, Tong YS, Benzie IFF. Antioxidant protection of edible oils. *Plant Foods Human Nutr.* 2007; 62: 39-42.

Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southweel-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. Gamma-tocopherol trap mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 3217 - 23.

Christopoulo E, Lazaraki M. Variations in free and esterified alcohols of olive oils during storage. *Riv. Ital. Sost. Grass.* 1997; 74: 191 - 200.

Cho JH. Advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2004; 6: 456 - 73.

Choe E, Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compreh. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2006; 5(4): 169 - 86.

Chu YH, Kung YL. A study on vegetable oil blends. *Food Chem.* 1998; 62: 191 - 5. Cichelli A, Oddone M, Specchiarello M. Sul contenuto di metalli in tracce in alcuni oli alimentari. *Riv. Ital. Sost. Gras.* 1992; 79: 401 - 7.



Ciesla WM. Non-wood forest products from conifers. Non-Wood Forest Products No. 12. FAO. Rome, 1998.

Cindric IJ, Zeiner M, Steffan I. Trace elemental characterization of edible oils by ICP-AES and GFAAS. *Microchem. J.* 2007; 85(1): 136 - 9.

Civantos L. Obtención del Aceite de Oliva Virgen. Agrícola Española, Madrid, 1999.

Clement M, Bourre JM. Graded dietary levels of RRR-gamma tocopherols include a marked increase in the concentrations of alpha and gamma-tocopherols in nervous tissue, heart, liver and muscle of vit E deficient rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 1997; 15: 173 - 81.

Cogswell JP, Scott DW. Role of self carriers in the immune response and tolerance. XII. Effect of epitope density and antigen-presenting cell phenotype on the presentation of hapten-modified self for the induction of immunity or tolerance *in vitro*. *Cell. Immunol.* 1988; 114; 71 - 82.

Commission on Oils, Fats and Derivatives. Determination of cooper, iron and nickel in oils and fats by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry: results of a collaborative study and the standardised method. *Pure Appl. Chem.* 1988; 60: 894 - 900.

Consejería de Agricultura y Pesca. Material de Referencia para Aceite de Oliva. Junta de Andalucía. Sevilla, 2006.

Consejo Oleícola Internacional. COI/T. 15/NC. Norma Comercial Aplicable al Aceite de Oliva y al Aceite de Orujo de Oliva. Nº 3/ Rev 2; 24 de noviembre de 2006.

Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ. Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1993; 90: 1771 - 5.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 1993; 69: 238 - 49.

Daddaoua A, Puerta V, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.* 2005; 135(5): 1164 - 70.

Daddaoua A, Puerta V, Requena P, Martínez-Férez A, Guadix E, de Medina FS, Zarzuelo A, Suárez MD, Boza JJ, Martínez-Augustín O. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.* 2006; 136(3): 672 - 6.

Daddaoua A, Martínez-Plata E, López-Posadas R, Vieites JM, González M, Requena P, Zarzuelo A, Suárez MD, de Medina FS, Martínez-Augustín O. Active hexose correlated compound acts as a prebiotic and is antiinflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.* 2007; 137(5): 1222 - 8.

Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 1449 - 54.

Dalenberg JW, Vandriel W. Contribution of atmospheric deposition to heavy metal concentrations in field crops. *Neth. J. Agric. Sci.* 1990; 38: 369 - 79.

Davidson WS, Gillotte KL, Lund-Katz S. The effect of high-density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 5882 - 90.

Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, Berg DJ, Rennick DM. T-helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 241 - 51.

De La Puerta VR, Martínez DE, Sánchez PJ, Ruiz GV. Effects of different dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils. *Metabolism* 2004; 53: 59 - 65.

De Leonardis A, Macciola V, Palmucci M. Il ferro in oli vergini d'oliva prodotti con il sistema classico. *Industrie Alimentari* 2000a; 39: 1119 - 22.

De Leonardis A, Macciola V, De Felice M. Copper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted nitric acid. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2000b; 35: 371 - 5.

De Leonardis A, Macciola V. Catalytic effect of the Cu(II) and Fe(III)-cyclohexanebutyrates on olive oil oxidation measured by Rancimat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104: 156 - 60.

Decisión 90/515/CEE de la Comisión, de 26 de septiembre de 1990, por la que se establecen los Métodos de Referencia para la Investigación de Residuos de Metales Pesados y de Arsénico (DOCE nº L 221 de 17.8.02).

Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Morales FJ. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 7832 - 6.

Delplanque B. The nutritional value of sunflower oils: linoleic sunflower seeds and seeds with high oleic content. *Oleagineux Corps. Gras. Lipid.* 2000; 7: 467 - 72.

Derouiche A, Cherki M, Drissi A, Bamou Y, El Messal M, Idrissi-Oudghiri A, Lecerf JM, Adlouni A. Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann. Nutr. Metab.* 2005; 49(3): 196 - 201.

Dessi MA, Deiana M, Day B, Rosa A, Banni S. Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids: effect of squalene. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104: 506 - 12.

Di Battista T, Cichelli A, Solinas M, Angerosa F. L'analisi statistica multivariate applicata alla determinazione dei metalli in oli vergini di oliva estratti con diversi sistemi. *Riv. Ital. Sost. Grass.* 1993; 70: 541 - 8.

Dobrev H. Clinical and instrumental study of the efficacy of a new sebum control cream. *Cosmet Dermatol.* 2007; 6(2): 113 - 8.

Douzane M, Bellal MM. Contribución a la caracterización de algunas variedades-población de olivo argelinas: estudio de determinados componentes menores de la fracción insaponificable. *Olivae* 2005; 103: 33 - 41.

Drissi A, Girona J, Cherki M, Godàs G, Derouiche A, El Messal M, Saile R, Kettani A, Solà R, Masana L, Adlouni A. Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin. Nutr.* 2004; 23: 1159 - 66.

Drissi A, Bennani H, Giton F, Charrouf Z, Fiet J, Adlouni A. Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Invest.* 2006; 24(6): 588 - 92.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102: 448 - 55.

Elliot J. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technol.* 1999; 53.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344 - 67.

Escarpa A, González MC. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta* 2001; 427: 119 - 27.

- Escrivá A, Esteve MJ, Farré R, Frígola A. Determination of liposoluble vitamin in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *J. Chrom. A*. 2002; 947: 313 - 8.
- Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers H. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 648 - 56.
- Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 619 - 22.
- Exileimages {sede Web}. {Acceso 30 de agosto de 2006}. Disponible en: [http://www.exileimages.co.uk/.../Morocco\\_07.html](http://www.exileimages.co.uk/.../Morocco_07.html).
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872 - 9.
- Farines M, Charrouf M, Soulier J. The sterols of *Argania spinosa* seed oil. *Phytochem.* 1981; 20: 2038 - 9.
- Farines M, Charrouf M, Soulier J, Cave A. Etude sur l'huile des graines d'*Argania spinosa* (L.) *Sapotaceae* - Stérols, alcools triterpéniques et méthylstérols de l'huile d'argan. *Rev. Franç. Corps Gras.* 1984; 31: 443 - 8.
- FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission 14<sup>th</sup> Session, 1981, rev. 2003.
- FAO/OMS. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos. *Comisión del Codex Alimentarius*, marzo, 2007.
- Fennema OR. *Química de los Alimentos*. Acribia. Zaragoza, 2000.
- Fernández-Pachón MS, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(12): 5024 - 9.
- Fernandez-Pachón MS, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *Publicación Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. 2006; 56 (2): 110 - 22.

- Flidder FJ, Oethoeffler AE. Metals in soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1981; 58: 270 - 2.
- Frankel E. In search for the better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Technol.* 1993; 4: 220 - 25.
- Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. A method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 1035 - 40.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 1912; 12: 239 - 43.
- Folin O, Ciocalteu V. Tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 1927; 73: 627 - 50.
- Franconi F, Coinu R, Carta S, Urgeghe PP, Ieri F, Mulinacci N, Romani A. Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 3121-5.
- Frankel N, Meyer AS. Review the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80: 1925 - 41.
- Fukushima M, Ohhashi T, Ohno S, Saitob H, Sonoyama K, Shimada K. Effects of diets enriched in *n*-6 or *n*-3 fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids* 2001; 36: 261 - 6.
- Galeazi F, Blennerhassett PA, Qiu B, O'Byrne PM, Collins SM. Cigarette smoke aggravates experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1999; 117: 877 - 83.
- Galvano F, La Fauci K, Graziani G, Ferracane R, Masella R, Di Giacomo C, Scacco A, D'Archivio M, Vanella L, Galvano G. Phenolic compounds and antioxidant activity of Italian extra virgin olive oil Monti Iblei. *J. Medicin. Food* 2007; 10(4): 650 - 6.
- Gao R, Stone WL, Huang T, Papas AM, Qui M. The uptake of tocopherols by RAW264.7 macrophages. *Nutr. J.* 2002; 1: 2 - 7.
- García E, Cabrera C, Lorenzo ML, Sánchez J, López MC. Daily dietary intake of chromium in southern Spain measured with duplicate diet sampling. *British J. Nutr.* 2001; 86: 391 - 6.

García JM, Gutiérrez F, Castellano JM, Perdequero S, Morilla A, Albi MA. Influence of storage temperature on fruit ripening and olive oil quality. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 264 - 7.

Garrido *et al.* (1993). Tomado de: Roca A. Estudio del contenido mineral como parámetro de calidad del aceite de oliva. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, 1997.

Gassull MA, Fernández-Bañares F, Cabré E, Papo M, Giaffer MH, Sánchez-Lombraña JL, Richart C, Malchow H, González-Huix F, Esteve M. European Group on Enteral Nutrition in Crohn's Disease. Fat composition may be a clue to explain the primary therapeutic effect of enteral nutrition in Crohn's disease: results of a double blind randomised multicentre European trial. *Gut* 2002; 51(2): 164 - 8.

Gassull MA. Review article: the role of nutrition in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20 (4): 79 - 83.

Gassull MA, Mané J, Pedrosa E, Cabré E. Macronutrients and bioactive molecules: is there a specific role in the management of inflammatory bowel disease? *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 2005; 29: 179 - 82.

Geerling BJ, Badart SA, Van DC *et al.* Nutritional supplementation with *n*-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: effects on antioxidant status and fatty acid profile. *Inflamm. Bowel Dis.* 2000; 6: 77 - 84.

Gester H.  $\beta$ -Carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1995; 49: 155 - 68.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess status: critical review and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 29(11): 1106 - 14.

Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56(8): 388 - 96.

Gil A, Sánchez de Medina F. Funciones y Metabolismo de los Nutrientes. En: *Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición* (Sánchez de Medina F, Gil A. Eds). Acción Médica. Madrid, 2005.

Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 4581 - 9.

Gimeno E, Calero E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre MC, López-Sabater MC. Simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A.* 2000; 881: 255 - 9.

Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre-Boronat MC, López-Sabater MC. The effects on harvest and extraction method on antioxidants (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene) content in virgin olive oil. *Food Chem.* 2002; 78, 207 - 11.

Gómez-Alonso S, Fregapane G, Salvador MD, Gordon MH. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 667 - 72.

González R, Sánchez de Medina F, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Duarte J, Zarzuelo A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. *J. Vitam. Nutr. Res.* 2001; 71(4): 243 - 50.

González R, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O, Nieto A, Gálvez J, Zarzuelo A. Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *British J. Pharmacol.* 2004; 141: 951 - 60.

González J, Cruz JM, Domínguez H, Parajó JC. Production of antioxidant from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chem.* 2004; 84: 243 - 51.

Gorinstein S, Martin-Belloso O, Katrich E, Lojek A, Ciz M, Gligelmo-Miguel N, Haruenkit R, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *J. Nutr. Biochem.* 2003; 14: 154 - 9.

Grisham MB, Ware K, Gilleland HE, Gilleland LB, Abell CL, Yamada T. Neutrophil-mediated nitrosamine formation: role of nitric oxide in rats. *Gastroenterol.* 1992; 103: 1260 - 6.

Gunasekera SP, Kumar V, Sultabawa US, Balasubramanian S. Triterpenoids and steroids of some *Sapotaceae* and their chemotaxonomic significance. *Phytochem.* 1977; 16: 923 - 6.

Gutfinger T. Polyphenols in olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1981; 58: 966 - 8.

Gutiérrez F, Fernández JL. Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of "extra" quality. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 571 - 7.

- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann. Acad. Sci.* 2000; 899: 136 - 47.
- Gysin R, Azzi AA, Visarius T. Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progresión and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J.* 2002; 16: 1952 - 4.
- Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12: 3668 - 72.
- Hegazi RA, Saad RS, Mady H, Matarese LE, O'Keefe S, Kandil HM. Dietary fatty acids modulate chronic colitis, colitis-associated colon neoplasia and COX-2 expression in IL-10 knockout mice. *Nutrition* 2006; 22(3): 275 - 82.
- Hernández M, Prieto EA. Plantas que contienen polifenoles: antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 1999; 18 (1): 12 - 4.
- Hilali M, Charrouf Z, El Aziz Soulhi A, Hachimi L, Guillaume D. Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 2081 - 7.
- Helzlsouer KJ, Huang HY, Alberg AJ. Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. *J. Cancer Inst.* 2000; 92: 2018 - 23.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Ipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang L, Scherer B, Sinclair D. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2003; 425: 191 - 6.
- Huang HY, Alberg AJ, Nokus E, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ. Prospective study of antioxidant micronutrients in the blood and the risk of developing prostate cancer. *Am. J. Epidemiol.* 2003; 157: 335 - 44.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1841 - 58.
- Institute of Medicine (USA) – Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. National Academy Press, Washington, 2000.
- Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M. Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. *Int. J. Mol. Med.* 2006; 17: 497 - 502.



IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II. *Spectrochim. Acta* 1978; 33B: 242 - 5.

Ivekovic D, Milardovic S, Roboz M, Grabaric BS. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *Analyst* 2005; 130: 708 - 14.

Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* 212: 256 - 71.

Jampol LM, Ferris FL. Antioxidants and zinc to prevent progression of age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 2001; 286 (19): 2466 - 8.

Jiang Q, Elson SL, Coutemanche C, Ames B.  $\gamma$ -Tocopherol and its major metabolite in contrast to  $\alpha$ -tocopherol inhibit cyclooxygenase activity in macrophage and epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97: 11494 - 9.

Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 6 - 10.

Kamimura H, Koga N, Oguri J, Yoshimura H. Enhanced elimination of theophylline, phenobarbital and strychnine from the bodies of rats and mice by squalene treatment. *J. Pharmacobiodyn.* 1992; 15: 215 - 21.

Kania M, Michalak M, Gogolewski M, Hoffmann A. Antioxidative potential of substances contained in cold pressed soybean oil and after each phase of refining process. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2004; 3: 113-21.

Keceli T, Gordon MH. The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.* 2001; 81: 1391 - 6.

Keys A, Minotti A, Karvonen MJ. The diet and 15 – year death rate in seven countries study. *Am. J. Epidemiol.* 1986; 124: 903 - 15.

Kew S, Mesa MD, Tricon S, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79: 674 - 81.

Khallouki F. Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of 3 african medicinal plants containing potent antiradical principles. Ph. D. Thesis. Universidad of Metz. Metz, 2003.

Khallouki F, Younos C, Soulimani T, Oster Z, Charrouf B, Spiegelhalder B. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur. J. Cancer Prev.* 2003; 12: 67 - 5.

Khallouki F, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW. Secondary metabolites of the argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. *African J. Biotechnol.* 2005; 4 (5): 381 - 8.

Kim DO, Lee KW, Lee CY. Vitamina C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3713 - 7.

Kiritsakis A. El Aceite de Oliva. Ediciones Madrid Vicente. Madrid, 1992.

Koga T, Terao J. Phospholipids increase radical-scavenging activity of vitamin E in a bulk oil model system. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 1450 - 4.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation base on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterol.* 1984; 87: 1344 - 50.

Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, Kou D, Itoh J, Binion DG, Levine AD, Blumberg RS, Fiocchi C. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56(12): 1696 - 705.

Kumar KV, Das UN. Effect of cis-unsaturated fatty acids, prostaglandins, and free radicals on angiotensin-converting enzyme activity in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997; 214: 374 - 9.

Lacoste F, Castera A, Lespaigne J. Dosage des métaux toxiques dans les corps gras: cadmium, plomb, étain, arsenic et chrome (méthodes et applications). *Rev. Franç. Corps. Gras.* 1993; 1-2: 19 - 31.

Lajolo F, Saura-Calixto F, Witting de Penna E, Wenzel de Meneses. Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud. Librería Varela, Ciudad de Buenos Aires, 2001.

Larsson L. Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass spectrometry: potential for diagnosis and studies on metabolism *in situ*: Review article. *APMIS* 1994 ; 102(3) : 161 - 9.

Le Core L, Fustier P, Chalabi N, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clin. Chim. Acta* 2004; 344: 115 - 21.

Lee A, Thurnham DI, Chopra M. Consumption of tomato products with olive oil but not sunflower oil increases the antioxidant activity of plasma. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 29(10): 1051 - 5.

Lendínez E, Lorenzo ML, Cabrera C, López MC. Chromium in basic foods of the Spanish diet: seafood, cereals, vegetables, olive oils and dairy products. *Sci. Total Environ.* 2001; 278: 183 - 9.

Lendínez E. Efecto del Proceso de Obtención sobre la Presencia de Metales en el Aceite de Oliva Virgen y su Relación con la Calidad Sensorial. *Memoria de Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. Granada, 2004.

Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am. J. Gastroenterol.* 2000; 95: 1213 - 20.

Lo Coco F, Monotti P, Rizzotti S, Ceccon L. Determination of copper (II) and lead (II) in olive oils by derivatized potentiometric stripping analysis. *Ital. J. Food Sci.* 2000; 4(12): 477 - 83.

Lodge VK, Traber MG, Elsner A, Brigelius-Flohé R. A rapid method for the extraction and determination of vitamin E metabolites in human urine. *J. Lipid. Res.* 2000; 41: 148.

Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterol.* 2004; 126: 1504 - 17.

Loftus EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 2002; 31: 1 - 20.

Long GL, Winefordner JD. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 1983; 55(7): 713.

López MC, López H. Grasas y Aceites. *Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos* (Ruiz López MD, Gil A. Eds). Acción Médica. Madrid, 2005.

López-Miguel C, Sicilia B, Sierra E, López-Zaborras J, Arribas F, Gomollon F. Incidence of inflammatory bowel disease in Aragón: outcome of a prospective population-based study. *Gastroenterol. Hepatol.* 1999; 22: 323 - 8.

- Lorén V, Mañé J, Pedrosa E. La administración de *Lactobacillus fermentum* (LF) después de la inducción de la colitis en ratones balb/c mejora la evolución de la lesión colónica. *Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 29: 188 (Abstract).
- Lybbert TJ, Barrett CB, Narjisse H. Market-based conservation and local benefits: the case of argan oil in Morocco. *Ecol. Econ.* 2002; 41: 125 - 44.
- Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, Cinelli MP, Carnuccio R. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005; 371(6): 457 - 65.
- Manna C, D'Angelo S, Migliardi V, Loffredi E, Mazzoni O, Morrica P, Galletti P, Zappia V. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6521 - 6.
- Mariani C, Venturi S. Sull'aumento delle cere durante la conservazione degli oli di olive. *Riv. Ital. Sost. Grass.* 1993; 73: 789 - 98.
- Marín RM, Llobat M, Castellote F, Mauri AR. Identificación de tocoferoles en aceites vegetales mediante el método de las curvas de contenido aparente. I Congreso Nacional de Ciencia de Tecnología de los Alimentos, Calidad y Seguridad Alimentaria. Madrid, 2001.
- Martínez-Augustín O, Aguilera CM, Gil A. Los Productos Lácteos. En: Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Instituto de Nutrición y Transtornos Alimentarios y Dirección General de Salud Pública y Alimentación de la Comunidad de Madrid. Pg. 128-55. Disponible en: <http://www.publicaciones-isp.org/productos/t065.pdf>.
- Martín-Polvillo M, Albi T, Guinda A. Determination of trace elements in edible vegetable oils by atomic absorption spectrophotometry. *J. AOCS* 1994; 71(4): 347 - 53.
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 2002; 82: 323 - 30.
- Mataix VJ, Martínez de Victoria E. El Aceite de Oliva. Bases para el Futuro. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Sevilla, 1988.
- Mataix VJ. Aceite de Oliva Virgen: Nuestro Patrimonio Alimentario. Universidad de Granada-Puleva Food. Granada, 2001.

Mataix J, Carazo E. Nutrición para Educadores. Díaz de Santos. Madrid, 1995.

Mateos R, Domínguez MM, Espartero JL, Cert A. Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocoferol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7170 - 5.

Maurin R. Argan oil *Argania spinosa* (L.) Skeels Sapotaceae. Rev. Franç. Corps. Gras. 1992; 39(5/6): 139 - 46.

Maurin R, Fellat-Zarrouck K, Ksir M. Positional analysis and determination of triacylglycerol structure of *Argania spinosa* seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1992; 69(2): 141 - 5.

Max Planck Institute for Social Anthropology {sede Web}. {Acceso 1 de septiembre de 2006}. Disponible en: <http://www.eth.mpg.de/people/turner/pictures.html>.

Mertens WG, Swidndells CE, Teasdales BF. Trace metals and the flavor stability of margarine. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1971; 48: 544 - 6.

Mesa GM, Aguilera GC, Gil HA. Importancia de los lípidos en el tratamiento nutricional de las patologías de base inflamatoria. *Nutr. Hosp.* 2006; 21(2): 30 - 43.

Michalska A, Ceglinska A, Amarowicz R, Konrad M, Szawara-Nowak D, Zielinski H. Antioxidant contents and antioxidative properties of traditional rye breads. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 734 - 40.

Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005 ; 21(3) : 389 - 94.

Mille et une huiles {sede Web}. {Acceso 30 de agosto de 2006}. Disponible en: [http://www.1001huiles.fr/en/argan\\_oil.htm](http://www.1001huiles.fr/en/argan_oil.htm).

Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993; 84, 407 - 12.

Montedoro GF, Servili M, Baldioni M, Miniati E. Simple and hidrolizable phenolic compounds in virgin olive oil. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 1992; 40: 1571 - 6.

- Morales FJ, Jiménez-Pérez S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.* 2001; 72: 119 - 25.
- Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45 (1): 13 - 9.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewezuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterol.* 1989; 96: 795 - 03.
- Mosca L, De Marco C, Visioli F, Cannella C. Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 297 - 301.
- Mountasser A, El-Hadek M. Optimization of factors influencing extraction of argan oil with a press. *OCL* 1999; 6(3): 273 - 9.
- Moussouris Y, Pierce A. Biodiversity links to cultural identity in southwest Morocco: The situation, the problems and proposed solutions. *Linkages between Cultural Diversity and Biodiversity* 2000; 48. Nov/Dec.
- Moussouris Y, Regato P. An overview of non timber forest products in the Mediterranean region. *FAO on-line publications*, 1999. {Acceso 31 de febrero de 2006}. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/x5593e/x5593e00.htm>.
- Mukhtar H, Ahmad N. Green tea chemoprevention of cancer. *Toxicol. Sci.* 1999; 52: 111 - 7.
- Nake A, Reyes M, Cerezo MJ, Martín MI. Determinación de hierro en aceites de oliva vírgenes con un plasma óptico de acoplamiento inductivo. *Alimentaria* 2000; 5: 91 - 5.
- Navarro M, Gil F, Gil A. Selenio, Manganeso, Cromo, Molibdeno, Yodo y otros Oligoelementos Minoritarios. En: *Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición* (Sánchez de Medina F, Gil A., Eds). Acción Médica. Madrid, 2005.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall B, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Effect of IL-12 and antibodies to IL-12 on established granulomatous colitis in mice. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 1996; 795: 368 - 70.

Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998; 43: 856 - 60.

Newmark HL. Squalene, olive oil and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1997; 6: 1101 - 3.

Nieto N, Torres MI, Ríos A, Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J. Nutr.* 2002; 132(1): 11 - 9.

Nieto N, Fernández MI, Torres MI, Ríos A, Suarez MD, Gil A. Dietary monounsaturated *n*-3 and *n*-6 long-chain polyunsaturated fatty acids affect cellular antioxidant defense system in rats with experimental ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43(12): 2676 - 87.

Niki E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly?. *Nutrition* 2002; 18: 524 - 5.

Ninfali P, Aluigi G, Bacchiocca M, Magnani M. Antioxidant capacity of extra-virgin oils. *J. American Oil Chem. Soc.* 2001; 78(3): 243 - 7.

Norme Marocaine 08.5.090. Service de Normalisation Industrielle Marocaine (SNIMA). Huiles d'Argane. Spécifications. Ministre de l'Industrie, du Commerce, de l'Energie et des Mines. Rabat, 2002.

Nota G, Naviglio D, Romano R, Sabia V, Musso S, Impronta C. Determination of the wax ester content in olive oils. Improvement in the method proposed by EEC Regulation 183/93. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 202 - 5.

Obied H, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 823 - 37.

O'Brien RC, Luo M, Balazs N, Mercuri J. *In vivo* and *in vitro* antioxidants properties of glicazide. *J. Diabetes Complications* 2000; 14: 201 - 6.

Okogeri O, Tasioula-Margari M. Changes occurring in phenolic compounds and alpha-tocopherol of virgin olive oil during storage. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(5): 1077 - 80.

Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J. Gastroenterol.* 2000; 35: 1075 - 81.

Ostlund RE, Racette SB, Stenson WF. Effects of trace compounds of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterol, oxysterol and squalene. *Nut. Rev.* 2002; 60: 349 - 59.

Owuor ER, Kong AT. Antioxidant and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharm.* 2002; 64: 765 - 70.

Oz HS, Ray M, Chen TS, McClain CJ. Efficacy of a transforming growth factor beta 2 containing nutritional support formula in a murine model of inflammatory bowel disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 2004; 23(3): 220 - 6.

Pacheco S, Hillier K, Smith C. Increased arachidonic acid levels in phospholipids of human colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin. Sci.* 1987; 73: 361 -4.

Paganuzzi V, De Jorge F, Maleaba A. Influenza dell'invecchiamento e della temperatura su alcuni parametri previsti dal Reg. CEE n° 2568/91 sull'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grass.* 1997; 74: 231 - 9.

Paine F, Paine H. Manual de Envasado de Alimentos. Madrid Vicente. Madrid, 1994.

Park YK, Park E, Kim JS, Kang MH. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat. Res.* 2003; 529: 77 - 86.

Paulo MG, Cabral HM, Morais JA, Almeida AJ. An isocratic method for the simultaneous determination of vitamins A, C, E y  $\beta$ -carotene. *J. Pharm. Biom. Anal.* 1999; 21(2): 399 - 6.

Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2-2'-azinobis(3-ethylenbenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology* 1999; 299: 379 - 89.

Pellegrini N, Visioli F, Buratti S, Brighenti F. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49: 2532 - 8.

Pellegrini N, Serafin M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J. Nutr.* 2003; 133(9): 2812 - 9.

Perán L, Camuesco D, Comalada M, Bailon E, Henriksson A, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J. A comparative study of the preventive effects exerted by three probiotics,



*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103(4): 836 - 44.

Pérez DD, Leighton F, Aspee A, Aliaga C, Lissi E. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biol. Res.* 2000; 33 (2): 71 - 7.

Pérez-Camino MC, Moreda W, Mateos R, Cert A. Simultaneous determination of long-chain aliphatic aldehydes and waxes in olive oils. *J. Chrom. A.* 2003; 983: 283 - 8.

Pérez F, Permanyer JJ. Estudio de las alteraciones vegetales termooxidativas de los aceites vegetales: aceite de oliva virgen y aceite de girasol refinado. *Grasas y Aceites.* 1986; 1: 29 - 32.

Pérez-Jiménez F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J. Clin. Invest.* 2005; 35: 421 - 4.

Perrin JL. Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Rev. Franc. Corps. Gras.* 1992; 1(2): 25 - 32.

Pineda D, Salucci M, Lázaro R, Mainani G, Ferro-Luzzi A. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 1999; 13 (2): 104 - 11.

Pinto P, Saraiva ML, Lima JL. A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system. *Anal. Chim. Acta* 2006; 555: 377 - 83.

Pirisi FM, Cabras P, Cao CF, Migliorini M, Muggelli M. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 1191 - 6.

Pita RG. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 1997; 11(1): 46 - 57.

Plat J, Mensink RP. Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2001; 11: 31 - 40.

Plat J, Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am. J. Cardiol.* 2005; 96: 15 - 22.

Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2002 ; 16 : 933 - 43.

Podolsky DK. Mechanisms of regulatory peptide action in the gastrointestinal tract: trefoil peptides. *J. Gastroenterol.* 2000; 35(12): 69 - 74.

Pour la Sauvegarde de l'Arganier {sede Web}. {Acceso 30 de agosto de 2006}. Disponible en: <http://www.argane.de/main.htm>.

Prevot A, Gente M, Morin O. Les progrès de l'absorption atomique et les corps gras. *Rev. Franc. Corps. Gras.* 1977; 24: 409 - 18.

Prevot A, Gente-Jaunlaux M, Morin O. Les progrès de l'absorption atomique et les corps gras. *Rev. Franc. Corps. Gras.* 1997; 24: 409 - 18.

Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51: 3273 - 9.

Prior RL, Wu X, Schainch K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53: 4290 - 2.

Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van de put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Rad. Res.* 2002; 36(2): 217 - 33.

Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou D. Alpha-tocopherol content of greek virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48(5): 1770 - 5.

Puerta FV. Regulación de la Expresión de la Linoleil-CoA Desaturasa de Rata. *Memoria de Tesis Doctoral.* Universidad de Granada. Granada, 2003.

Puig-Deu M, Buxaderas S. Determinación de plomo en grasas comestibles por plasma acoplado por inducción y espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. *Grasas y Aceites.* 1990; 41(3): 233 - 6.

Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 2000 ; 48 : 3396 - 02.

Rahmani M. Production, technologie et commercialisation des noix d'argan. Aménagement sylvopastoral et agro-forestier de l'arganeraie et de la tétraclinaie de la commune rurale Ida Trhouma, AEFCS. Aboukassim. Essaouira, 1995.

Rahmani M. Mise au point sur le role des pigments chlorophylliens dans la photooxydation de l'huile d'olive vierge. *Rev. Marocaine* 1990; 73: 11 - 21.

Rahmani M. The chemical composition of "virgin" argan oil. *Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones/Agricultures* 2005; 14(5): 461 - 5.

Ramakers JD, Mensink RP, Verstege MI, Te Velde AA, Plat J. An arachidonic acid-enriched diet does not result in more colonic inflammation as compared with fish oil or oleic acid-enriched diets in mice with experimental colitis. *Br. J. Nutr.* 2008; 21: 1 - 8.

Ramirez MC, Quiles JL. Vitamina C, Vitamina E y otros Antioxidantes. En: *Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición* (Sánchez de Medina F, Gil A., Eds). Acción Médica. Madrid, 2005.

Ranalli A, Ferrante ML, De Mattia G, Costantini N. Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 417 - 24.

Ray B, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Condamine E, Driouich A, Lerouge P. Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterisation of a novel xyloglucan motif. *Carbohydrate Res.* 2004; 339: 201 - 8.

Ray KA. Role of lipoproteins in inflammation. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227 - 38.

Re R, Pellegrinni N, Proteggente A, Pannala AS, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Rad. Biol. Med.* 1999, 26: 1231 - 7.

Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 590 - 600.

Real Decreto nº 308/1983 de la Presidencia del Gobierno, de 25 de enero, por el que se Aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de los Aceites Vegetales Comestibles (BOE nº 44, de 21 de febrero de 1983).

Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 635 - 9.

Reglamento (CEE) nº 2568/1991 de la Comisión de 11 de julio de 1991, relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L248 de 5.9.91).

Reglamento (CE) nº 183/1993 de la Comisión de 29 de enero de 1993, por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/1991 relativo a las Características de los Aceites de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L 022 de 30.01.93) y modificaciones posteriores.

Reglamento (CE) nº 796/2002 de la Comisión, de 6 de mayo de 2002, por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L128 de 15.5.02).

Reglamento (CE) nº 1989/2003 de la Comisión, de 6 de noviembre de 2003, que modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91, relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L195 de 13.11.03).

Rennick D, Davidson N, Berg D. Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995; 76: 174 - 8.

Rezanka T, Rezanková H. Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Anal. Chim. Acta* 1999; 398: 253 - 61.

Rice-Evans CA, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzimology* 1994; 234: 279 - 93.

Roberts RH. Sanidad Alimentaria. Zaragoza. Acribia, 1981.

Roca A. Estudio del Contenido Mineral como Parámetro de Calidad del Aceite de Oliva. *Memoria de Tesis Doctoral.* Universidad de Granada. Granada, 1997.

Roca A, Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Niveles de calcio, magnesio, manganeso, zinc, selenio y cromo en aceites de oliva comercializados en Andalucía. *Grasas y Aceites* 2000; 51(6): 393 - 9.

Roca A, Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Contenido de plomo y cadmio en aceites de girasol. *Grasas y Aceites* 2001; 52 (3-4): 229 - 34.

Rodrigo N, Alegría A, Barberá R, Farré R. High-performance liquid chromatographic determination of tocopherols in infants formulas. *J. Chrom. A.* 2002; 947: 97 - 102.

Rodríguez R, Ballester A. Influencia de la Sanidad Vegetal en la Calidad del Aceite de Oliva. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, 1991.

Romani A, Mulinacci N, Pinelli P, Vincieri FF, Cimato A. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 964 - 7.

Romani A, Lapucci C, Cantini C, Ieri F, Mulinacci N, Francesco V. Evolution of minor polar compounds and antioxidant capacity during storage of bottled extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(4): 1315 - 20.

Romano R, Riccio F, Borriello I, Toraldo G. Catalytic effect of Cu(II) and Fe(III) on kinetic oxidation of fatty substances: the soybean oil case. *Riv. Ital. Sost. Grass.* 2007, 84(1): 25 - 32.

Romero C, Brenes M, Yousfi K, García P, García A, Garrido A. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 479 - 84.

Roy N, Barnett M, Knoch B, Dommels Y, McNabb W. Nutrigenomics applied to an animal model of inflammatory bowel diseases: transcriptomic analysis of the effects of eicosapentaenoic acid and arachidonic acid enriched diets. *Mutat. Res.* 2007; 622(1-2): 103 - 16.

Royero HA. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev. Colomb. Gastroenterol.* 2003; 24 - 41.

Ruiz-López MD, Artacho R, Fernández MA, López H, López, M.C. Stability of  $\alpha$ -tocopherol in virgin olive oil during microwave heating. *Food Technol.* 1995; 28, 644 - 6.

Ruiz López MC, Artacho R, Fernández Pineda MA, López García de la Serrana H, López Martínez MC. Stability of  $\alpha$ -tocopherol in virgin olive oil during microwave heating. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995; 28: 644 - 6.

Ryan D, Robards K, Lavee S. Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae* 1998; 75: 31 - 6.

Salcedo C. Analysis of fats and oils. *Alimentación: Equipos y Tecnología* 1991; 10: 52 - 65.

Salvador MD, Aranda F, Gómez-Alonso S, Fregapane G. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chem.* 2003; 80: 359 - 66.

Saro C, Lacort M, Argueller G, Antón J, García R, Navascues CA. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias, Spain. *Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 23: 322 - 7.

Samane S, Noël J, Charrouf Z, Amarouch H, Selim Haddad P. Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seeds extracts. *Advance Access Publication* 2006; 3(3): 317 - 27.

Samaniego C. Estudio y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Aceites de Oliva Virgen Extra. Implicación en la Salud. *Memoria de Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. Granada, 2006.

Samaniego C, Troncoso AM, García-Parrilla MC, Quesada JJ, López H, López MC. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta* 2007; 593: 103 - 7.

Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O, González R, Ballester I, Nieto A, Gálvez J, Zarzuelo A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68(12): 2317 - 26.

Sánchez-Machado DI, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. High-performance liquid chromatographic determination of tocopherols in microalgae. *J. Chrom. A.* 2002; 976: 277 - 84.

Sánchez-Moreno C, Plaza L, De Ancos B, Cano MP. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 1997; 76: 270 - 6.

Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, *et al.* Infliximab maintenance therapy for fistulising Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 876 - 85.

Saudi Aramco World. Ardent for argan, 2006. Volumen 55, nº 5. {Acceso 20 de junio de 2006}. Disponible en: <http://www.saudiaramcoworld.com/issue/200405/ardent.for.argan.htm>.

Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, Hopia A, Huynh-BA T, Lambelet P, Mcpail D, Skibsted LH, Tijburg. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays

based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 2001; 212 (3): 319 - 28.

Seidemann J. Falsification of fatty oil of *Argania spinosa* (L). *Deutsche-Lebensmittel-Rundschau* 1998; 94(1): 26 - 7.

Shahidi F. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. *J. Food Sci.* 2004; 69: 146 - 9.

Sherhan CN. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2005; 8: 115 - 21.

Shils ME, Olson JA, Shike M. *Modern Nutrition in the Health and Disease.* Lea & Febiger. Malvern, 1994.

Shoda R. Therapeutic efficacy of *n*-3 polyunsaturated fatty acid in experimental Crohn's disease. *J. Gastroenterol.* 1995; 8: 98 - 101.

Slavin W. *Graphite Furnace AAS: A Source Book.* Perkin-Elmer Corporation. Norwalk, 1990.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150: 76 - 85.

Smith WL. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends Biochem. Sci.* 2008; 33(1): 27 - 37.

Sociedad Española de Dietética y Ciencia de la Alimentación, 2006. La rueda antioxidante de los alimentos. Disponible en: <http://www.nutrición.org/>. Consultada: 6 de febrero de 2006.

Solinas M, Angerosa F, Cichelli A. Determinazione del contenuto di metalli negli oli vergini di oliva prodotti con diverse tecniche: dosaggio di cobalto, manganese, rame, piombo, stagno per spettrofotometria di assorbimento atomico con fornace di grafite. *Amm. Ist. Sper. Elaiot.* 1984; 87: 10.

Speek AJ, Schrijver J, Schreus WHP. Vitamin E composition of some seed oils as determined by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Food Sci.* 1985; 50: 121 - 124.

Statgraphics Plus, version 4.1, Statistical Graphics Corp. Copyright 1994-1999.

Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM, Shah AM, Chessin LN, Segal HL, Chey WY. An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York: Hospital incidence. *Gastroenterol.* 1990 ; 98 : 104 - 10.

Stussi I, Henry F, Moser PH, Danoux L, Jeanmaire CH, Gillon V, Benoit I, Charrouf Z, Pauly G. *Argania spinosa* – How ecological farming, fair trade and sustainability can drive the research for new cosmetic active ingredients. *SÖFW-Journal* 2005 (10); 131: 35 - 46.

Su Q, Rowley KG, O'Dea K. Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherol in human plasma during exposure to light and alter extraction. *J. Chrom. B* 1999; 729: 191 - 8.

Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry – ACS Committee on Environmental Improvement. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 1980; 52: 2242 - 9.

Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, Summers R, Mekhjian H, Greenberger N, Kelly M. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut.* 1991; 32: 1071 - 5.

Sykes AP, Brampton C, Klee S, Chander CL, Whelan C, Parsons ME. An investigation into the effect and mechanisms of action of nicotine in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.* 2000; 49: 311 - 9.

Szydłowska-Czerniak A, Karlovits G, Dianoczki C, Recseg K, Szlyk E. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapessed and olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008; 85: 141-9.

Takada R, Saitoh M, Mori T. Dietary gamma-linolenic acid-enriched oil reduces body fat content and induces liver enzyme activities relating to fatty acid beta-oxidation in rats. *J. Nutr.* 1994; 124: 469 - 74.

Talwar D, Ha TK, Cooney J, Brownlee C, O'Reilly D. A routine method for the simultaneous measurement of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* 1998; 270: 85 - 100.

Te Velde AA, van Kooyk Y, Braat H, Hommes DW, DelleMijn TA, Slors JF, van Deventer SJ, Vyth-Dreese FA. Increased expression of DC-SIGN+IL-12-18+ and CD83+IL-12-IL-18-dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 143 - 51.



Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, Drillenburger P, van Deventer SJ, Chvatchko Y, Te Velde AA. Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF- $\alpha$  production in mice. *Gastroenterol.* 2001; 121: 1372 - 9.

The Epoch Times {sede Web}. {Acceso 30 de agosto de 2006}. Disponible en: <http://www.theepochtimes.com/news/6-1-4/36515.htm>.

Tous J, Romer A, Plana J, Guerrero L, Díaz I, Hermoso JF. Características químico-sensoriales de los aceites de oliva "arbequina" obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites* 1997; 48 (6): 415 - 24.

Trautwein EA, Rieckhoff D, Kunath-Rau A, Erbersdobler HF. Replacing saturated fat with PUFA-rich (sunflower oil) or MUFA-rich (rapeseed, olive and high-oleic sunflower oil) fats resulted in comparable hypocholesterolemic effects in cholesterol-fed hamsters. *Ann. Nutr. Metab.* 1999; 43: 159 - 72.

Triantafyllidis JK, Papalois AE, Parisi A *et al.* Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 6843 - 7.

Tuberoso C, Kowalczyk A, Sarritzu E, Cabras P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oil seeds for food use. *Food Chem.* 2007; 103(4): 1494 - 01.

Turunen UM, Farkkila MA, Seppala K, Sivonen A, Ogren M, Vuoristo M, Valtonen VV, Miettinen TA. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterol.* 1998; 115: 1072 - 8.

Uceda M, Aguilera MP, Beltrán G, Jiménez A. Aceites de Oliva Vírgenes Extra. Calidad y Diversidad. Ed. Patrimonio Comunal Olivarero. Junta de Andalucía. Sevilla, 2000.

Uchida K, Mizuno H, Hirota K. Effects of spinasterol and sitosterol on plasma and liver cholesterol levels and biliary and faecal sterol and bile acids excretion in mice. *J. Pharmacol.* 1983; 33: 103 - 12.

UNE-EN ISO 9936: 2006. Aceites y Grasas de Origen Animal y Vegetal. Determinación del Contenido de Tocoferol y Tocotrienol Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución. AENOR, Madrid, 2007.

Valavanidis A, Nisiotou C, Papageorgiou Y, Kremli I, Satravelas N, Zinieris N, Zygalki H. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions for

- olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 2358 - 65.
- Valkonen M, Kussi T. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J. Lipid Res.* 1997; 38: 823 - 33.
- Valenzuela BA, Uauy DI. Funciones Biológicas y Metabolismo de los Ácidos Grasos Esenciales y de sus Derivados Activos. En: *Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición* (Sánchez de Medina F, Gil A., Eds). Acción Médica. Madrid, 2005.
- Van der Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 1999, 66: 511 - 7.
- Van der Sluis A, Dekker M, Van Boekel N. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice: stability during storage. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1073 - 80.
- Van Nederkassel AM, Daszykowski M, Massart DL, Vander Heyden Y. Prediction of total green tea antioxidant capacity from chromatograms by multivariate modelling. *J. Chrom. A.* 2005; 1096: 177 - 86.
- Velioglu YS, Mazza L, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 4113 - 7.
- Viladrich E, Fordadell M, Buxaderas S, Mariné-Font A. Determinación de cobre e hierro en grasas comestibles por espectrofotometría de absorción atómica y plasma acoplado por inducción. *Grasas y Aceites* 1986; 37(2): 77 - 80.
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. The antioxidant activity of wines determined by ABTS<sup>•+</sup> method: influence of simple dilution and time. *Talanta* 2004; 64: 501 - 9.
- Villano D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. *Anal. Chim. Acta* 2005; 538: 391 - 8.
- Villaseñor IM, Domingo P. Anticarcinogenicity potential of spinasterol isolated from squash flowers. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 2000; 20: 99 - 105.
- Viola P. El Aceite de Oliva y Salud. *Consejo Oleícola Internacional*. Madrid, 1997.

Vioque A, Villagrau MP. Elementos traza en grasas comestibles VII: Análisis espectrográfico de trazas metálicas. *Grasas y Aceites* 1967; 11: 71 - 8.

Vioque A, Albi T, Albi A, Nosti M. Elementos traza en grasas comestibles. Aplicación de la desmetalización a aceites de oliva refinados. *Grasas y Aceites* 1968; 19: 81 - 8.

Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Activation state alters the effect of dietary fatty acids on proinflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* 2000; 12(9): 1374 - 9.

Wallace JL, Reuter B, Cicala C, McKnight W, Grisham MB, Cirino G. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterol.* 1994; 107: 173 - 9.

Wang CC, Chu CY, Chu KO, Choy KW, Khaw KS, Rogers MS, Pang CP. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin. Chem.* 2004; 50 (5): 952 - 4.

Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.* 1985; 187 (1): 33 - 7.

Weber P, Bendich A, Manchain LJ. Vitamin E and human health: rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition* 1997; 13: 450 - 60.

WHO (World Health Organization). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. *Forty-first Report of the Joint FAO-WHO. Expert Committee on Food Additives.* Geneva, 1993.

Whiting C, Bland P, Tarlton J. Dietary *n*-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2005; 11: 340 - 9.

Wild GE, Drozdowski L, Tartaglia C, Clandinin MT, Thomson AB. Nutritional modulation of inflammatory response in inflammatory bowel disease – from the molecular to the integrative to the clinical. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(1): 1 - 7.

Wong KH, Fung YS, Fung KW. Determination of trace amounts of copper in palm oil by differential-pulse-anodic-stripping voltammetry. *Analyst* 1980; 105: 30 - 6.

Yaghmur A, Aserin A, Garti N. Evaluation of argan oil for deep-fat frying. *Lebensm Wiss. Technol.* 2001; 34: 124 - 30.

Yamada T, Grisham MB. Pathogenesis of Tissue Injury: Role of Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen. En: *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Shanahan F, Targan SR, Ed. Williams and Wilkins Editorial. Baltimore, Maryland. 1994.

Ziller S. *Grasas y Aceites Alimentarios*. Acribia. Zaragoza, 1996.

Zit Sidi Yassine, s.a.r.l. {sede Web}. {Acceso 4 de septiembre de 2006}. Disponible en: [http://www.sidiyassine.com/html/argana\\_e.html](http://www.sidiyassine.com/html/argana_e.html).

