

“ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN Y DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE ARGÁN VIRGEN EXTRA. COMPARACIÓN CON OTROS ACEITES VEGETALES COMESTIBLES”



TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA NUTRICIÓN ANIMAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN HUMANA

DOCTORANDA:

ASCENSIÓN RUEDA ROBLES

DIRECTORES:

CARMEN CABRERA VIQUE

ISABEL SEIQUER GÓMEZ-PAVÓN

MANUEL OLALLA HERRERA

2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Ascensión Rueda Robles

ISBN: 978-84-9125-179-8

URI: <http://hdl.handle.net/10481/40438>

Dra. Carmen Cabrera Vique. Catedrática de la Universidad de Granada

Dra. Isabel Seiquer Gómez-Pavón. Científico Titular del CSIC

Dr. Manuel Olalla Herrera. Profesor Titular de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se presentan en la memoria de tesis doctoral: “Estudio de la composición y de las propiedades antioxidantes del aceite de argán virgen extra. Comparación con otros aceites vegetales comestibles” han sido realizados por la Licenciada Ascensión Rueda Robles bajo nuestra dirección y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones, y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Granada ante el tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Y para que conste, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada,...27... de...marzo... de 2015.

Directores de la Tesis

Doctoranda

Fdo.:

Fdo.:

Dra. Carmen Cabrera Vique

Lda. Ascensión Rueda Robles

Dra. Isabel Seiquer Gómez-Pavón

Dr. Manuel Olalla Herrera

Dr. MIGUEL NAVARRO ALARCÓN, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por **Ascensión Rueda Robles**, Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Máster en Nutrición Humana por la Universidad de Granada, en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.

Granada.....de.....de 2015.

Fdo. Miguel Navarro Alarcón



Universidad de Granada

La presente memoria de Tesis Doctoral se ha realizado gracias al apoyo de los grupos de investigación AGR141 y AGR177 de la Junta de Andalucía, al proyecto del plan propio de investigación de la Universidad de Granada, y a la concesión por parte del CEI Biotic de una Beca de ayuda a la enseñanza práctica dirigida a investigadores en formación de Programas de Doctorado de la Universidad de Granada.

El trabajo experimental se ha realizado en el departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y en el departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (Estación Experimental del Zaidín) de Armilla, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Además, se ha llevado a cabo una colaboración con la Unidad de Espectrometría del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada para la optimización de algunas técnicas.

AGRADECIMIENTOS

Han pasado ya casi más de 9 años y medio desde que la Universidad de Granada, y más concretamente la Facultad de Farmacia, me dieran la bienvenida, y ahora en esta etapa tan importante de mi vida que toca a su fin, quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, tanto de forma directa como indirecta, han hecho posible la realización de ésta Tesis.

Me gustaría comenzar agradeciendo especialmente a mis directores la Dra Carmen Cabrera Vique, la Dra Isabel Seiquer Gómez-Pavón y el Dr Manuel Olalla Herrera, por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo éste proyecto. Vuestros conocimientos, experiencia, dedicación, persistencia, paciencia y motivación, han sido piezas clave para mi formación en investigación. A Carmen Cabrera por transmitirme esa positividad de continuar siempre hacia delante, esas ganas de trabajar, y por su inagotable implicación desde principio a fin. A Isabel Seiquer por aceptarme desde el principio y guiarme en todo momento, por su esfuerzo, sacrificio y por no tirar la toalla nunca. A Manuel Olalla por su disposición a ayudarme siempre, por su orientación, por dejarme equivocarme por mí misma, enseñarme, por todas esas palabras de apoyo y por la confianza. Gracias por aportarme lo mejor de cada uno de vosotros y creer en mí. Un millón de gracias.

Al departamento de Nutrición y Bromatología y al departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal de la estación experimental del Zaidín por la gran acogida y cariño que me han brindado durante este tiempo, llegando a convertirse en mi segunda casa. Por hacer posible la realización del trabajo por su apoyo técnico y humano. Durante este tiempo, mi paso por ambos lugares me ha permitido conocer a grandes personas: Miriam, Triana, Thayra, Vito, Javier, Celia, Jimmy, Cristina, Silvia, Thays, Ana, Mary, Patri, Migue, Lucre y todas esas personas con las que he compartido este tiempo, y sin las cuales el paso por el laboratorio no habría sido el mismo.

A Tarsi por su buena disposición a ayudar en todo aquello que le he pedido buscar. Gracias por tu alegría de todos los días. A María Luisa, Eduardo y a todas las personas que trabajan en el departamento de Nutrición por haber formado parte en mi enseñanza universitaria y personal.

Al profesor Dr Rafael Giménez Martínez, por haberme ayudado desde el minuto uno con mis amigos los cromatógrafos, los cuales nos daban la lata alguna vez que otra. Gracias por tus palabras de ánimo y comprensión.

A la profesora Dra Ana María Rivas Velasco, por haberme dado siempre tan buenos consejos. Gracias por tu ayuda, por tener siempre una sonrisa y por esos reconfortantes abrazos.

A Luis Lara Escribano, por su gran ayuda con la estadística y por enseñarme con paciencia todo aquello que al principio me eran tan poco familiar.

A la unidad de cromatografía líquida del centro de instrumentación científica de la Universidad de Granada, por ilustrarme en el mundo de los sistemas UPLC, y en especial a Samuel Cantarero Malagón. Gracias por la paciencia al resolver mis dudas y por los ratos de risa.

A mi gran familia de la carrera, de piso, amigos del máster y a mi grupo de jacas. Todos aquellos con los que he podido compartir grandes momentos: Marta, Vero, Paqui, Andrés, Fran, Sara, Balta, Vicky, Silvia, Esteban, Lourdes, Anabel, Sara torrecampeña, Ana, Teresa, Lidia, Mónica, Rocio y Mari Carmen. Gracias por vuestro apoyo, sois personas increíbles....¡¡unos máquinas!!.

A mis amigos de toda la vida y compañía, por haber luchado conmigo siempre y nunca dejarme caer. Por haber estado y estar siempre ahí, en lo malo y en lo bueno: Laure, Hermi, Angel, Juande y Elena.

A mis padres y mi hermano, que desde que nací e incluso antes, ya estábais buscando maneras de ofrecerme lo mejor. Gracias por todo el apoyo, confianza y amor incondicional, corrigiendo mis fallos y celebrando mis triunfos. Sin vuestro esfuerzo y sacrificio nunca lo habría conseguido. Os quiero.

Muchas gracias a todos

A mis padres

“Existe una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

Albert Einstein



ÍNDICE



I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. Obtención del aceite de argán virgen

2. Composición del aceite de argán virgen

2.1 Perfil en ácidos grasos

2.2 Fracción insaponificable

2.2.1 Tocoferoles

2.2.2 Polifenoles

2.2.3 Escualeno

2.2.4 Fitoesteroles

2.2.5 Coenzima Q₉, Q₁₀ y melatonina

2.2.6 Saponinas

2.2.7 Metales traza

2.2.8 Otros compuestos minoritarios

3. Propiedades antioxidantes

3.1 Bioaccesibilidad de antioxidantes

4. Efectos saludables del consumo de aceite de argán virgen en la prevención y/o tratamiento de diversas patologías

4.1 Enfermedades cardiovasculares

4.2 Diabetes

4.3 Procesos cancerígenos

4.4 Enfermedad inflamatoria intestinal

4.5 Respuesta inmune

4.6 Otras patologías

5. Anafilaxis y toxicidad del aceite de argán

6. Bibliografía

III. DISEÑO DEL ESTUDIO

1. Muestras

- 1.1 Aceite de argán virgen
- 1.2 Otros aceites vegetales comestibles

2. Control de calidad de las muestras

3. Diseño experimental

IV. ASPECTOS METODOLÓGICOS

1. Parámetros de calidad

- 1.1 Grado de acidez
- 1.2 Índice de peróxidos
- 1.3 Medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta
(K_{270} y K_{232})
- 1.4 Metalez traza

2. Determinación del perfil de ácidos grasos

3. Polifenoles

- 3.1 Totales: método de Folin Ciocalteu
- 3.2 Individuales
 - 3.2.1: Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
 - 3.2.2: Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)

4. Tocoferoles

5. Digestión “*in vitro*”

6. Capacidad antioxidante

- 6.1 Método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)
- 6.2 Método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)
- 6.3 Ensayo FRAP (ferric reducing antioxidant power)

7. Cultivos celulares

- 7.1 Ensayos de viabilidad celular
 - 7.1.2 Método de tinción con azul tripán
 - 7.1.3 Método de tinción con rojo neutro
- 7.2 Especies reactivas del oxígeno (ROS)

7.3 Ensayos de absorción

7.3.1 Integridad de la monocapa: transporte del rojo fenol

7.3.2 Desarrollo del ensayo

8. Análisis estadístico

9. Bibliografía

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Parámetros de calidad de los aceites de estudio.
2. Estudio del perfil en ácidos grasos del aceite de argán virgen y otros aceites vegetales comestibles mediante cromatografía de gases y análisis discriminante.
3. Aplicación de métodos analíticos y quimiométricos en la caracterización del aceite de argán virgen extra y otros aceites comestibles. Papel de los polifenoles, los tocoferoles y la actividad antioxidante.
4. Bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos individuales del aceite de argán virgen extra utilizando UPLC-ESI-MS/MS.
5. Análisis de la biodisponibilidad de los polifenoles y las propiedades antioxidantes del aceite de argán virgen extra mediante digestión simulada y absorción a través de células Caco-2. Estudio comparativo con el aceite de oliva virgen extra.

VI. RESÚMEN

VII. CONCLUSIONES

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Criterios de calidad para la categoría extra del aceite de argán virgen de acuerdo a la Norme Marocaine 08.5.090 Standard (2003).
- Tabla 2. Descripción de las muestras analizadas.
- Tabla 3. Cantidades de muestra a pesar según el índice de peróxidos.
- Tabla 4. Características analíticas del método para la determinación de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb por ETA-AAS.
- Tabla 5. Condiciones del método cromatográfico para la determinación de ácidos grasos.
- Tabla 6. Gradiente de elución para la determinación y cuantificación de polifenoles.
- Tabla 7. Ecuaciones de regresión de las rectas de calibrado, % de recuperación y límites de cuantificación y detección.
- Tabla 8. Condiciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos.
- Tabla 9. Parámetros obtenidos para el método cromatográfico utilizado.
- Tabla 10. Factores de división para el cálculo de la concentración de tocoferoles.
- Tabla 11. Determinación de parámetros de calidad en aceite de argán virgen extra.
- Tabla 12. Determinación de parámetros de calidad en otros aceites vegetales comestibles.
- Tabla 13. Determinación de metales traza en aceite de argán virgen extra.
- Tabla 14. Determinación de metales traza en aceites vegetales comestibles.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Fruto fresco y hueso (imagen izquierda). Semillas del argán (imagen derecha).
- Figura 2. Plantación de árboles de argán.
- Figura 3. Aceite de argán.
- Figura 4. Rotura manual del hueso.
- Figura 5. Molienda de las semillas.
- Figura 6. Esquema del proceso de obtención tradicional del aceite de argán.
- Figura 7. Molienda mecanizada de las semillas.
- Figura 8. Tostado mecanizado de las semillas.
- Figura 9. Esquema del proceso semi-industrial de obtención del aceite de argán.
- Figura 10. Cooperativa donde las mujeres elaboran el aceite de argán.
- Figura 11. Principales grupos de compuestos polifenólicos.
- Figura 12. Esquema general de todos los análisis y ensayos realizados en los aceites.
- Figura 13. Cromatógrafo de gases de la Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Figura 14. Obtención de los ésteres metílicos.
- Figura 15. HPLC utilizado para la determinación de los compuestos fenólicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.
- Figura 16. Esquema del proceso de obtención del extracto.
- Figura 17. Espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.
- Figura 18. Separación del sobrenadante de la parte residual.
- Figura 19. Esquema del proceso de digestión "in vitro".

- Figura 20. Liofilización de las muestras y filtro utilizado con los digeridos.
- Figura 21. Placa multipocillo para la lectura del ensayo ABTS
- Figura 22. Recta de calibrado obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.
- Figura 23. Placa multipocillo para la lectura del ensayo DPPH
- Figura 24. Curva de calibrado obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.
- Figura 25. Placa multipocillo para la lectura del ensayo FRAP
- Figura 26. Curva de calibrado obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.
- Figura 27. Falcon utilizado para el cultivo de las células Caco-2.
- Figura 28. Incubador y cabina de flujo laminar.
- Figura 29. Pellet de células formado tras centrifugación.
- Figura 30. Monocapa de células Caco-2 en confluencia con estructura típica de mosaico (microscopía óptica).
- Figura 31. Cámara de Neubauer utilizada para el contaje de células.
- Figura 32. Microscopio invertido.
- Figura 33. Placa multipocillo para el ensayo de tinción de rojo neutro.
- Figura 34. Determinación de especies de oxígeno reactivo (ROS).
- Figura 35. Placas Transwell.
- Figura 36. Esquema del ensayo de transporte.

ABREVIATURAS

- ❖ **ABTS:** Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico).
- ❖ **ABTS●+:** Radical del ácido 2,2' -azinobis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico).
- ❖ **AGMI:** Ácidos grasos monoinsaturados.
- ❖ **AGPI:** Ácidos grasos poliinsaturados.
- ❖ **AGS:** Ácidos grasos saturados.
- ❖ **CGL:** Cromatografía gas-líquido.
- ❖ **COI:** Consejo Oleícola Internacional.
- ❖ **DAD:** Diodo Array detector.
- ❖ **DCF:** Fluoresceína.
- ❖ **DCFH:** Diclorofluoreceína.
- ❖ **DMEM:** Dulbecco's modified minimal essential medium.
- ❖ **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
- ❖ **DPPH●:** Radical del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
- ❖ **ECACC:** Colección Europea de Cultivos Celulares.
- ❖ **ECV:** Enfermedades cardiovasculares.
- ❖ **EFSA:** European Food Safety Authority.
- ❖ **EII:** Enfermedad inflamatoria intestinal.
- ❖ **ESI:** Electrospray ionization.
- ❖ **ETA-AAS:** Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica.
- ❖ **FDA:** Food and drug administration.
- ❖ **FRAP:** Capacidad de reducción férrica del plasma.
- ❖ **HBSS:** Hank's balanced salt solution.
- ❖ **HDL:** Lipoproteínas de alta densidad.

- ❖ **HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia.
- ❖ **IL-1 α :** Interleuquina 1 α .
- ❖ **IL-6:** Interleuquina 6.
- ❖ **IP:** Índice de peróxidos.
- ❖ **LDL-c:** Lipoproteínas de baja densidad colesterol.
- ❖ **LOD:** Límite de detección.
- ❖ **LOQ:** Límite de cuantificación.
- ❖ **LpA:** Lipoproteína A.
- ❖ **MIBK:** Metil-isobutil-cetona.
- ❖ **MRM:** monitorización de múltiples reacciones.
- ❖ **MS/MS:** Espectrometría de masas tándem.
- ❖ **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- ❖ **ROS:** Especies reactivas del oxígeno.
- ❖ **TFN:** Factor de necrosis tumoral.
- ❖ **TG:** Triglicéridos.
- ❖ **TPTZ:** Complejo tripiridiltriazina.
- ❖ **TROLOX:** Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-cromato-2-carboxílico.
- ❖ **UNESCO:** United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization.
- ❖ **UPLC:** Cromatografía líquida de ultra resolución.
- ❖ **UV/VIS:** Ultravioleta/Visible.



I. INTRODUCCIÓN

Y

OBJETIVOS



El aceite de argán es un aceite que se obtiene de las semillas contenidas en el fruto del árbol del argán (*Argania spinosa*), que es una drupa de color verde que contiene un hueso de cáscara dura en cuyo interior se encuentran las semillas (de 2 a 3) (**Figura 1**). La morfología de este árbol milenario que data de la Era Terciaria, recuerda a la del olivo, aunque con múltiples ramas espinosas (**Figura 2**). Llega a alcanzar los 10 m de altura y una antigüedad de hasta 150-200 años. El fruto tarda más de un año en madurar y alcanza un peso medio de unos 20 gramos (El Abbassi *et al.* 2014).

Etimológicamente, la palabra argán procede del vocablo bereber *arjân*, derivado de *rajnah*, que significa “estar encerrado” por su carácter endémico en zonas muy concretas (Khallouki *et al.* 2005). Se trata de una especie endémica del suroeste de Marruecos, del norte del Sáhara Occidental (en las cercanías de El Aaiún y Smara) y de la provincia de Tindouf en el oeste de Argelia. El área de cultivo abarca una extensión de unos 8280 km² (Guillaume y Chaurrouf, 2011) con más de 21 millones de árboles que ejercen un papel esencial en la estabilidad de un ecosistema especialmente árido (El Abbassi *et al.* 2014).



Figura 1. Fruto fresco y hueso (imagen izquierda). Semillas del argán (imagen derecha).

El área geográfica de cultivo de argán fue declarada en 1998 por la UNESCO como “Reserva de la Biosfera”. En la actualidad se están realizando estudios para extender su cultivo a otras regiones marroquíes, a otros países fronterizos o incluso a Israel (Sour *et al.* 2011).

Es una especie con una extraordinaria tradición etnobotánica entre los pueblos bereberes del suroeste de Marruecos (Morton y Voss, 1987; Boukhobza y Pichon, 1988; Bellakhdar, 1997; Charrouf y Guillaume, 1999; Ahansal *et al.* 2008), con un gran valor paisajístico y con un papel fundamental en la economía de la zona (Al-Menaie *et al.* 2008). Su madera es muy valorada en ebanistería y marquetería; también como combustible. Sus raíces, hojas y corteza se emplean en forma de decocciones en procesos curativos de gastritis, úlceras, dolores de cabeza, fiebre, etc. Pero especialmente apreciado es el aceite, muy consumido en la dieta habitual y utilizado como remedio contra diversas enfermedades.



Figura 2. Plantación de árboles de argán.

La mayor parte de la producción del aceite destinado a la alimentación, se consume en Marruecos. Puede suponer hasta el 25% de la ingesta lipídica diaria y ha sido durante siglos, alimento esencial en la dieta bereber (*Amazigh diet*). Es muy apreciado por sus propiedades organolépticas; presenta un color que oscila de “dorado” a “caoba”, sabor suave y notas aromáticas a “avellana” y “almendra tostada” (**Figura 3**).

Hasta hace aproximadamente un par de décadas, este peculiar aceite era considerado fuera de estas latitudes como un producto exótico adquirido por visitantes y turistas. Este hecho ha cambiado de forma radical, y en la actualidad está adquiriendo considerable interés gastronómico, nutricional y terapéutico en otros países, siendo considerado el “oro del desierto”, sin olvidar la gran expansión

comercial en el sector de la cosmética, convirtiéndose a escala mundial, en el “producto revelación” de los últimos 10 años (Guillaume y Charrouf, 2011).



Figura 3. Aceite de argán virgen.

Hoy día la producción se ha incrementado notablemente gracias a la mecanización parcial del proceso de extracción del aceite y a una apuesta por incrementar la calidad del producto obtenido. Se exporta a países como Francia, Reino Unido, Alemania, Italia, España, Portugal, Bélgica, Estados Unidos y Japón, entre otros.

Desde el punto de vista nutricional, hay que destacar que el aceite de argán destinado a alimentación es un aceite virgen, no sometido a ningún proceso de refinado previo a su consumo. Por tanto, mantiene intacta la fracción insaponificable. Es bien conocido que el proceso de refinado de los aceites disminuye radicalmente su contenido en antioxidantes, hasta en un 60-80%.

Algunos autores asemejan la fracción insaponificable del aceite de argán virgen a la del aceite de oliva virgen, a la que atribuyen gran parte de los efectos saludables que estudios recientes, tanto epidemiológicos como *in vivo*, están demostrando. Esto unido a una composición en ácidos grasos, en la que destacan los ácidos linoleico y oleico. Sin embargo, hay tres hechos importantes que es preciso resaltar:

- a) Aunque la zona de producción de aceite de argán es relativamente restringida y por tanto, su composición no debería presentar grandes fluctuaciones, tanto

los datos bibliográficos como nuestra propia experiencia, demuestran todo lo contrario, en especial en lo referente a componentes minoritarios. Esto en parte puede ser debido a que hasta hace poco tiempo, el método de obtención del aceite era muy rudimentario y poco estandarizado, como comentaremos en apartados posteriores. Esto unido a un mal proceso de envasado y conservación, ya que principalmente se comercializaba “a granel”, provoca que la calidad del producto obtenido fuera realmente dispar.

- b) La mayoría de los estudios efectuados sobre los efectos saludables del consumo habitual de aceite argán, no aportan datos específicos sobre la composición y la calidad de los aceites ingeridos o ensayados. Consideramos imprescindible este aspecto para una mejor interpretación de los resultados derivados de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.
- c) No existe en la bibliografía un estudio amplio y comparativo en cuanto a perfil en ácidos grasos y actividad antioxidante de este aceite en relación al aceite de oliva virgen *extra* (aceite tomado como referente en cuanto a calidad nutricional) ni tampoco en relación a otros aceites vegetales ampliamente consumidos. Además, no sólo es importante conocer la presencia de compuestos bioactivos sino también, la bioaccesibilidad de estos en el tracto gastrointestinal como fase previa para evaluar su biodisponibilidad.

Por tanto, la **hipótesis de partida** para la realización de esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizar un estudio amplio sobre la composición y la actividad antioxidante del aceite de argán virgen de la mejor calidad (calidad extra) a fin de obtener datos actualizados, representativos y concluyentes. Y a la vez, realizar un estudio comparativo frente al aceite de oliva virgen extra y otros aceites vegetales comestibles.

En base a estas premisas, los **objetivos** planteados han sido:

Objetivo 1.

Efectuar un estudio exhaustivo del perfil en ácidos grasos del aceite de argán virgen extra y otros aceites vegetales comestibles, aplicando técnicas estadísticas avanzadas para establecer las principales diferencias y similitudes entre ellos, en función de estos parámetros.

Objetivo 2.

Analizar el perfil de polifenoles, el contenido en tocoferoles y la actividad antioxidante del aceite de argán virgen extra y de otros aceites vegetales vírgenes, y estudiar la contribución de las variables analizadas a la caracterización de los aceites mediante métodos estadísticos discriminantes.

Objetivo 3.

Determinar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos individuales del aceite de argán virgen extra antes y después de un proceso de digestión simulada, y utilizando la técnica analítica UPLC-ESI-MS/MS.

Objetivo 4.

Evaluar la biodisponibilidad de los polifenoles totales y de las propiedades antioxidantes del aceite de argán mediante técnicas de digestión *in vitro* y ensayos con cultivos celulares. Analizar, además, el papel protector de la fracción bioaccesible frente a un estrés oxidativo inducido.



II. ANTECEDENTES

BIBLIOGRÁFICOS



1. Obtención del aceite de argán virgen

Los frutos del árbol del argán son recolectados entre los meses de mayo y agosto y se dejan secar al sol para eliminar el pericarpio y obtener los huesos. Éstos presentan gran dureza y es preciso partirlos con piedras para obtener las semillas. Para la extracción del aceite a partir de estas semillas se emplean dos métodos: el “método tradicional” o “artesanal”, bastante rudimentario y empleado a escala familiar desde antiguo por mujeres de la zona, y el método “semi-industrial”, parcialmente mecanizado.

En el método tradicional (**Figuras 4, 5 y 6**), se procede al tostado de las semillas en recipientes de terracota (alcanzando temperaturas que superan los 100 ° C) y a la molturación con una muela rotatoria hasta obtención de la pasta oleosa que una vez amasada con agua, se prensa también manualmente. Posteriormente la mezcla aceite/agua se separa por decantación. Con este método además de una reducida higiene sanitaria, se obtiene un rendimiento en aceite inferior al 30% (referido a semilla) y se necesitan aproximadamente 10 horas para la producción de 1 litro de aceite (El Abbassi *et al.* 2014). Por supuesto, la calidad de este aceite suele ser muy baja, ya que es muy factible la alteración de los compuestos minoritarios en función de las condiciones de tostado de la semilla, adición de agua, prensado, etc.



Figura 4. Rotura manual del hueso.

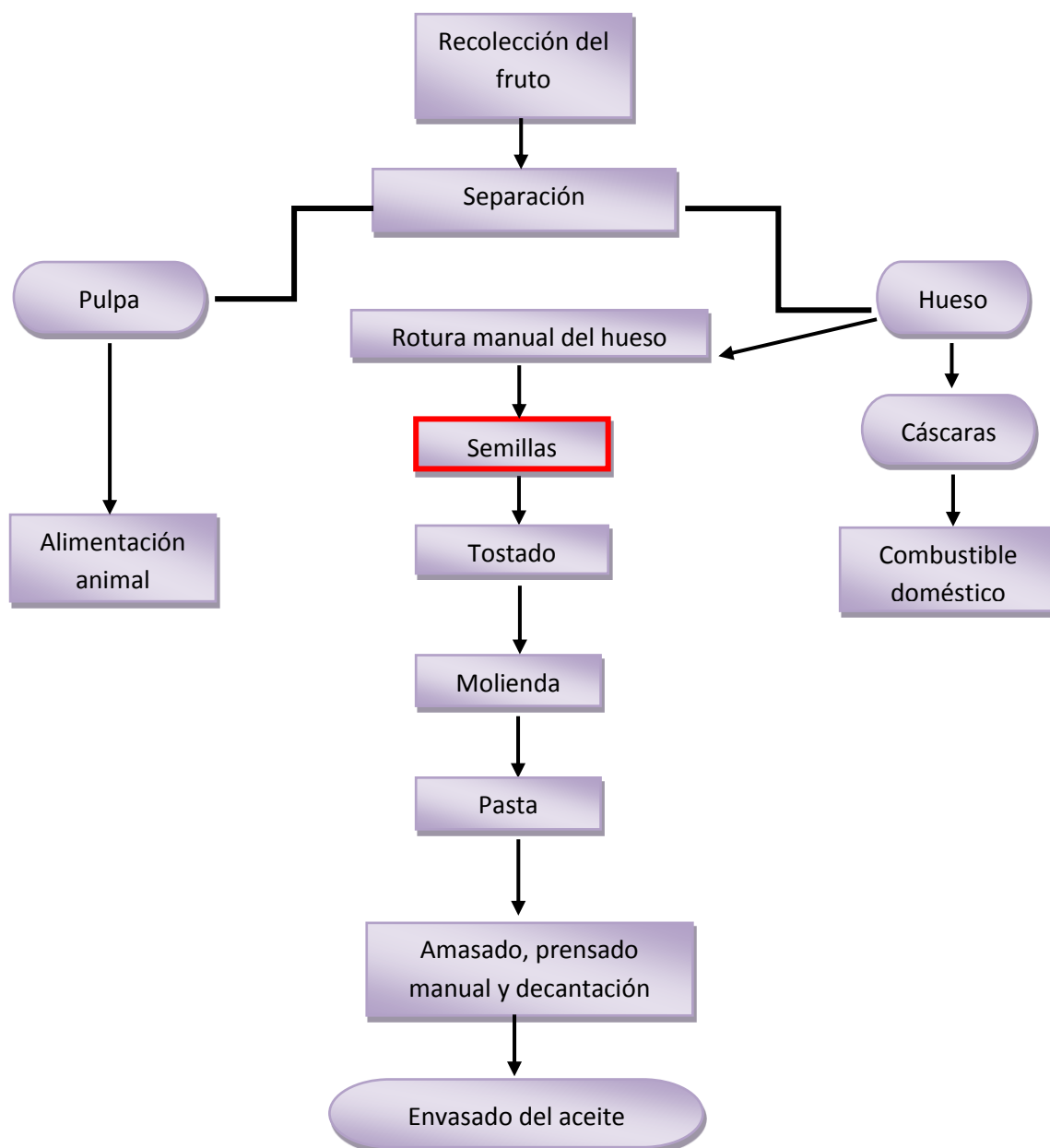


Figura 6. Esquema del proceso de obtención tradicional del aceite de argán.

En el método semi-industrial (**Figuras 7, 8 y 9**), además de seleccionar la materia prima y eliminar la adición de agua durante el amasado de la pasta, los procesos de tostado, molturación y prensado se realizan de forma mecanizada, siendo puntos críticos que exigen un estricto control (Harhar *et al.* 2011). Hoy en día, se tiende al prensado en frío, sin aplicación de calor en esta etapa. También suelen estar mecanizadas las etapas de decantación, filtración y envasado. Esta paulatina estandarización y mejora del método de producción y envasado ha supuesto un

notable incremento en el rendimiento obtenido (hasta el 43%) y por supuesto, en la calidad nutricional y sensorial y en la estabilidad del producto obtenido. Se precisan aproximadamente 2 horas para obtener 1 litro de aceite (El Abbassi *et al.* 2014).

Estos avances tecnológicos en el método semi-industrial han sido aprovechados en los últimos años por varias cooperativas de mujeres establecidas en Marruecos, concretamente en las zonas de Essaouria y Agadir, que producen y comercializan a gran escala, aceite de elevada calidad. Casi el 90% de la economía rural de estas regiones depende de la producción de aceite de argán (**Figura 10**).



Figura 7. Molienda mecanizada de las semillas.



Figura 8. Tostado mecanizado de las semillas.

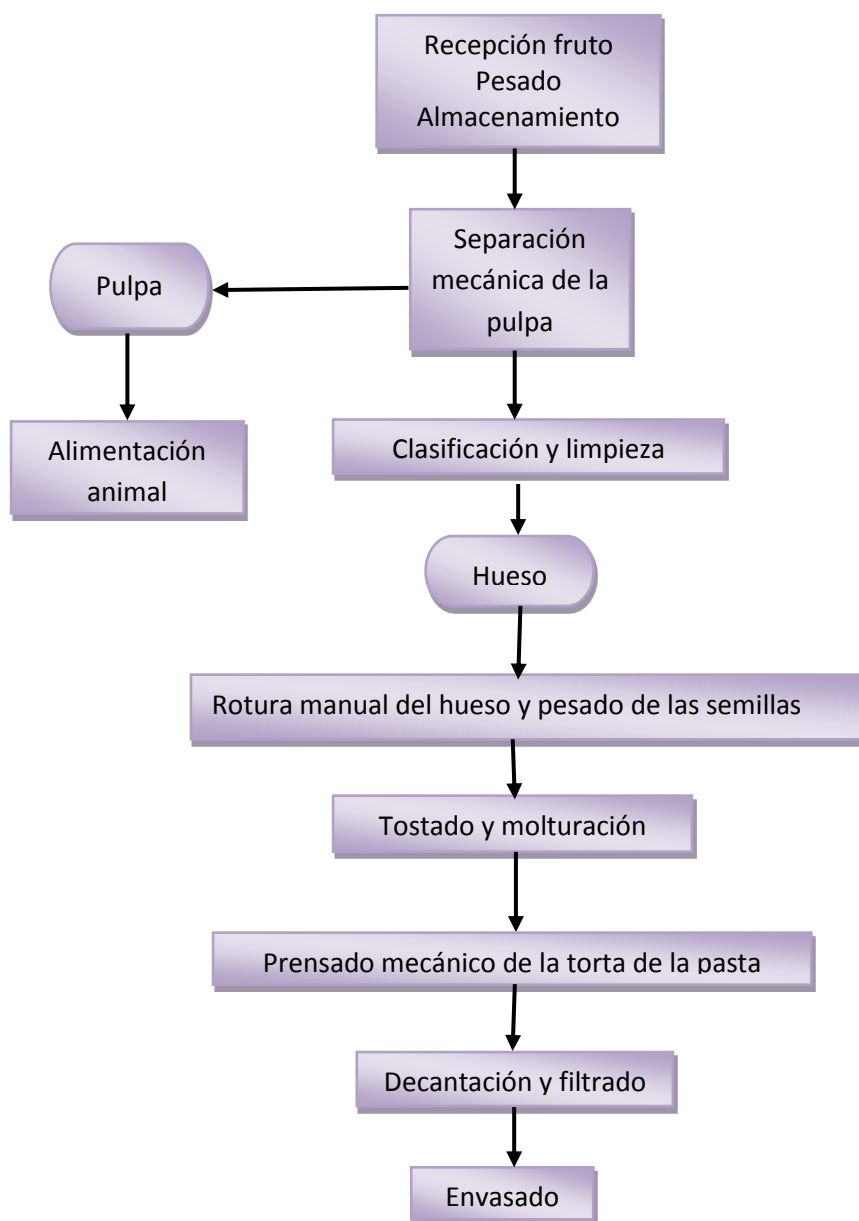


Figura 9. Esquema del proceso semi-industrial de obtención del aceite de argán.

La extracción del aceite con disolventes se reserva para aceite destinado a cosmética u otros usos industriales (El Abbassi *et al.* 2014).

Por otra parte, destacar que “en pro” controlar la calidad del aceite, en 2003 aparece una normativa específica, inexistente hasta entonces, para el aceite de argán virgen (Norme Marocaine 08.5.090), en la que se establecen los criterios de calidad que establecen las distintas categorías en las que podemos encuadrar el aceite de argán: virgen extra, virgen fino y virgen corriente, en orden decreciente de calidad.



Figura 10. Cooperativa donde las mujeres elaboran el aceite de argán.

Ya que en la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en la más alta calidad del aceite de argán (virgen extra), en la **tabla 1** se recogen los parámetros de calidad correspondientes a dicha categoría.

Tabla 1. Criterios de calidad para la categoría extra del aceite de argán virgen de acuerdo a la Norme Marocaine 08.5.090 Standard (2003)

Parámetro	Límite máximo	Parámetro	Límite máximo
Grado de acidez (% ácido oleico, m/m)	≤ 0.8	Criterios organolépticos Olor y sabor	no sabores "a rancio" ni extraños Flavor característico
Índice de peróxidos (meq O ₂ activo/kg aceite)	≤ 15	Humedad e impurezas volátiles (% m/m)	≤ 0.1
K ₂₇₀	≤ 0.35	Disolventes halogenados	≤ 0.1
ΔK	≤ 0.01	Aditivos	No permitidos
Metales traza (mg/kg)		Impurezas insolubles en éter de petróleo (% m/m)	≤ 0.3
Hierro	≤ 3.0		
Cobre	≤ 0.1		
Plomo	≤ 0.1		
Arsénico	≤ 0.1		

2. Composición del aceite de argán virgen

Como se ha comentado anteriormente, los datos sobre la composición de este aceite vegetal comestible, tanto bibliográficos como los obtenidos por nuestro grupo de investigación, muestran una amplia variabilidad (Hilali *et al.* 2005; Cayuela *et al.* 2008; Marfil *et al.* 2008; Matthäus *et al.* 2010; Marfil *et al.* 2011) que puede ser debida a varios factores:

1. Origen geográfico, aunque el área de producción está bastante localizada, los factores climatológicos ejercen cierta influencia.
2. Condiciones de cultivo y especialmente, época de recogida del fruto. Diversos estudios muestran la clara influencia de una óptima maduración del fruto sobre el contenido en tocoferoles totales y en la estabilidad oxidativa del aceite.
3. Proceso de obtención, siendo parámetros críticos en su contenido en antioxidantes y en la estabilidad oxidativa del producto, la temperatura y tiempo de tostado de la semilla y la adición de agua durante el amasado de la pasta, previo a la separación del aceite.
4. Condiciones de envasado y conservación del producto (Khallouki *et al.* 2003; Cayuela *et al.* 2008; Harhar *et al.* 2011).

A continuación se resumen algunos datos disponibles en bibliografía sobre la composición media del aceite, que se amplían en las correspondientes publicaciones que se adjuntan en la memoria.

2.1 Perfil en ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de naturaleza lipídica que presentan una cadena hidrocarbonada de diferente número de carbonos y en cuyo extremo hay un grupo carboxilo (-COOH). El átomo de carbono de su extremo se encuentra unido a 3 átomos de hidrógeno (H₃C-), y el resto de los carbonos que tienen libres los dos enlaces, son ocupados igualmente por átomos de hidrógeno (CH₂). En algunos ácidos grasos esta cadena se encuentra totalmente saturada (no tienen dobles enlaces) y sin ramificar, mientras que otros tienen uno o más dobles enlaces.

Cuando los ácidos grasos se esterifican a través del $-OH$ del grupo carboxilo con una molécula de glicerol se forma lo que se conoce como triglicérido, forma en la cual se encuentran habitualmente los ácidos grasos, aunque también podemos encontrarlos como ácidos grasos libres, acilgliceroles, glicerofosfolípidos y ésteres de colesterol.

Los ácidos grasos se pueden clasificar según su longitud de cadena:

- De cadena corta: entre 4 y 6 átomos de carbono.
- De cadena media: entre 8 y 12 átomos de carbono.
- De cadena larga: entre 14 y 18 átomos de carbono.
- De cadena muy larga: más de 20 átomos de carbono.

En función del grado de insaturación:

- Ácidos grasos saturados (AGS): no poseen dobles enlaces en su molécula.
- Ácidos grasos insaturados (AGI): poseen un doble enlace o más de uno entre los átomos de carbono de su cadena, separados por un grupo metileno. Dentro de éstos se incluyen:
 - Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI): Poseen un único doble enlace.
 - Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI): poseen más de un doble enlace.

El aceite de argán, presenta un 45% de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), un 35% de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y un 20% de ácidos grasos saturados (AGS). Destaca un contenido medio, entre 36-48%, de ácido oleico ($C_{18}:\omega_9$) y entre 30-36% de ácido linoleico ($C_{18}:\omega_6$). Presenta aproximadamente un 13% de ácido palmítico ($C_{16}:0$), un 4% de esteárico ($C_{18}:0$) y entre 0.1-0.2% de α -linolénico ($C_{18}:\omega_3$). Prácticamente no hay datos sobre otros ácidos grasos minoritarios y no se ha detectado la presencia de ácido erúcico (Khallouki *et al.* 2003; Cherki *et al.* 2006; Charrouf y Guillaume, 2010; Sour *et al.* 2011; Cabrera-Vique *et al.* 2012). Los triglicéridos del aceite de argán 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). Por otro lado, los ácidos grasos saturados suelen esterificar en las posiciones externas, situándose en la posición 1 preferentemente el ácido palmítico, y en la posición 3 el ácido esteárico (Rahmani, 2005)

Es bien conocido el interés nutricional de los ácidos oleico y linoleico. El ácido oleico, entre otros efectos positivos para la salud humana, reduce de forma significativa los niveles de LDL e incluso aumenta ligeramente los niveles de HDL (Lopez-Huertas, 2010). Además, estudios recientes muestran un efecto hipotensor (Terés *et al.* 2008). Por su parte, el ácido linoleico es un ácido graso esencial con implicaciones positivas en las enfermedades cardiovasculares (ECV), la diabetes o el cáncer. Dietas ricas en AGPI ω -6 disminuyen las concentraciones de colesterol total y LDL-colesterol (LDL-c) (Czernichow *et al.* 2010; Gillingham *et al.* 2011).

2.2 Fracción insaponificable

Se denomina fracción insaponificable a la suma de aquellos componentes de un aceite que se pesan como residuo no volátil después de una reacción de saponificación (formación de jabón) a partir de una disolución acuosa alcalina tras la extracción con éter etílico o éter de petróleo.

Representa un 1.1% aproximadamente del aceite y se ha comprobado la presencia de:

▪ 2.2.1 Tocoferoles.

Son un grupo de compuestos con un anillo central de cromanol al que se une una cadena lateral saturada de fitol, siendo el más característico la vitamina E. Con este nombre se conocen 8 compuestos de las familias de los tocoferoles y de los tocotrienoles, el α , β , γ y δ -tocoferol y el α , β , γ y δ -tocotrienol. Difieren en el número y posición de los grupos metilo unidos al anillo central de cromanol y en su actividad, siendo el α -tocoferol la forma más abundante en la naturaleza (aproximadamente del 80%) y la de mayor actividad biológica. El término “vitamina E” se utiliza a menudo para referirse a todos los tocoferoles (“complejo vitamínico E”), pero estrictamente hablando sólo debería aplicarse al α -tocoferol. La función principal de los tocoferoles es la de actuar como antioxidante a nivel celular, especialmente protegiendo a los

ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. De aquí derivan los efectos beneficiosos de los tocoferoles frente a diversos tipos de patologías como cáncer, diabetes y enfermedad de Alzheimer, entre otras (Ramírez-Tortosa y Quiles Morales, 2005; Badui, 2006).

El contenido en tocoferoles marca la principal diferencia en cuanto a componentes minoritarios del aceite de argán con el aceite de oliva virgen (≈ 300 mg/kg), pudiendo presentar valores totales que superan los 600 mg/kg (Charrouf *et al.* 2008). La Norma Marroquí 08.5.090 (2003) establece un límite de referencia entre 60 y 90 mg/100 g, siendo la temperatura de tostado de la semilla un factor crítico en su destrucción (Harhar *et al.* 2011).

En un estudio previo efectuado por nuestro grupo de investigación en aceites de argán virgen de procedencia muy dispar, sobre todo en cuanto a método de obtención y comercialización (la mayoría eran comercializados a granel), encontramos un contenido total en tocoferoles entre 427.0 y 654.0 mg/kg (Marfil *et al.* 2011). Estos valores son similares a los aportados por Khallouki *et al.* (2003) y Cayuela *et al.* (2008) pero inferiores a los aportados por Charrouf y Guillaume (2010), con valores entre 600-900 mg/kg.

La principal fracción corresponde a γ -tocoferol (80-85% del total), mientras que las fracciones α -, δ - y β -tocoferol representan un 8, entre 8-12 y un 0.3%, respectivamente (Khallouki *et al.* 2003; Marfil *et al.* 2011). La actividad biológica (como vitamina E) del β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol en relación al α -tocoferol, es del 30, 15 y 1%, respectivamente. Sin embargo, el poder antioxidante decrece en el orden: δ -tocoferol $>$ γ -tocoferol \approx β -tocoferol $>$ α -tocoferol (Khallouki *et al.* 2003; Drissi *et al.* 2004). En el aceite de oliva virgen predomina la fracción α -tocoferol.

El γ -tocoferol es un potente antioxidante con actividad antiinflamatoria y sus niveles en plasma juegan un papel importante en la prevención primaria de las patologías coronarias (Jiang *et al.* 2001). Parece demostrado que dietas ricas en γ -tocoferol protegen frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), implicadas en

procesos inflamatorios (Charrouf y Guillaume, 2010). El γ -tocoferol incrementa la absorción de α -tocoferol e inhibe de forma más eficaz que el α -tocoferol, las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa así como la proliferación de células cancerígenas (Jiang *et al.* 2000).

• 2.2.2 Polifenoles.

Los polifenoles son moléculas bioactivas que actúan como secuestrantes de radicales libres. Son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura, al menos un anillo aromático al que están unidos uno o más grupos hidroxilo (Mercado-Mercado *et al.* 2013). Están presentes en todas las plantas y, por tanto, también en la dieta. Hay más de 8000 estructuras fenólicas que han sido identificadas, existiendo desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados. Se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, y pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica (**Figura 11**). Entre esta gran variedad de compuestos fenólicos, los mayoritarios son los flavonoides, con más de 5000 tipos distintos.

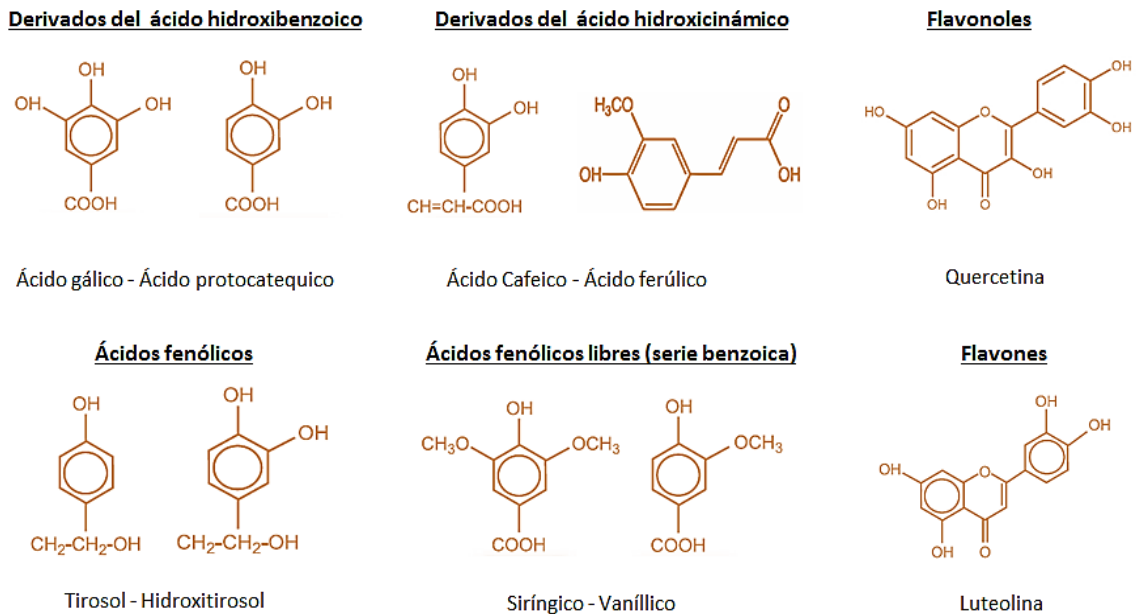


Figura 11. Principales grupos de compuestos polifenólicos

Su principal efecto protector es actuar como captadores de radicales libres concediéndoles capacidad antioxidante que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer (Ramírez-Tortosa y Quiles Morales, 2005; Tomás Barberán, 2003).

En los últimos años, los científicos se han interesado especialmente por el efecto de los polifenoles frente a los ROS, así como en los daños involucrados en enfermedades como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, demencia, Parkinson y enfermedad o degeneración muscular. Se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Quiñones *et al.* 2012), así como proteger contra lesiones celulares y subcelulares, inhibir el crecimiento de tumores, activar los sistemas de detoxificación hepáticos y bloquear las vías metabólicas que pueden ocasionar carcinogénesis (Mercado-Mercado *et al.* 2013).

Los compuestos fenólicos favorecen la estabilidad del aceite al ejercer un papel protector frente a la degradación de los tocoferoles y la autooxidación de los AG, durante los procesos de almacenamiento y en los tratamientos culinarios.

La bibliografía aporta datos muy variables, entre 3.3 y 150 mg/kg expresados como ácido gálico (Khallouki *et al.* 2003; Drissi *et al.* 2004; Sour *et al.* 2011). En nuestro estudio antes referido y realizado con aceites de diversa calidad (n=26), encontramos valores que oscilaron entre 6.07-152.04 mg/kg (referidos a ácido gálico) con un coeficiente de variación de 54.8% (Marfil *et al.* 2011). En cualquier caso, este contenido es inferior al que aporta el aceite de oliva virgen pero bastante superior al de otros aceites vegetales comestibles. Temperaturas y tiempos de tostado de la semilla excesivos así como la adición de agua durante el proceso de obtención del aceite, pueden disminuir de forma drástica el contenido fenólico.

Un informe de la European Food Safety Authority (EFSA, 2011) señala el efecto positivo de los polifenoles del aceite de oliva virgen sobre la oxidación de las LDL, siendo un efecto dosis-dependiente. Presumiblemente, este efecto puede ser compartido por los polifenoles del aceite de argán virgen.

En cuanto a los polifenoles individuales identificados en el aceite de argán, Khallouki *et al.* (2003) encontraron una concentración media de ácido ferúlico de 3147 µg/kg. El ácido ferúlico es un potente antioxidante que además, parece disminuir la glucemia, los niveles de colesterol plasmático y de LDL-c y ejercer un efecto positivo en enfermedades inflamatorias y degenerativas. También se han identificado el ácido cafeico y en menor cantidad, tirosol y los ácidos siríngico y vainillico.

El ácido cafeico presenta actividad antioxidante, es efectivo en la prevención y tratamiento de la obesidad, mejora la tolerancia a la glucosa, disminuye los niveles de lípidos plasmáticos y hepáticos y la tensión arterial, mejora la distribución del pool de minerales, induce apoptosis de células cancerígenas y podría disminuir los niveles de ansiedad (Muñoz *et al.* 2010).

Existen algunos estudios en los cuales se identifican los polifenoles individuales presentes tanto en diferentes partes del fruto del argán como en el aceite, sin embargo los datos son escasos. Así Charrouf *et al.* (2007) identifican en la pulpa los ácidos gálico, protocatéquico, rutina o hesperidin, entre otros. El ácido *p*-hidroxibenzoico y la vanillina también han sido identificados en el aceite de argán así como otros compuestos con estructuras similares a los compuestos fenólicos y que requieren de una mayor investigación (El Abbassi *et al.* 2014).

▪ 2.2.3 Escualeno.

El escualeno es un potente agente quelante de metales y anti-radicales libres. Es un compuesto de origen natural conocido principalmente por su papel clave como intermediario en la síntesis de colesterol. La evidencia disponible sugiere que una cantidad sustancial de escualeno en la dieta se absorbe y se convierte en colesterol en los seres humanos; sin embargo, este aumento en la síntesis no se asocia con aumentos consecuentes de los niveles de colesterol en suero, posiblemente debido a un aumento en la eliminación fecal (Strandberg *et al.* 1990). La principal fuente de este compuesto la encontramos en el aceite de hígado de tiburón, aunque se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es sintetizado por los humanos (Kelly, 1999). Presenta interés como antiinflamatorio y en la prevención de la aterosclerosis, diferentes tipos de cánceres y el daño causado por el consumo de tabaco, también se ha comprobado en experimentación animal, que incrementa la

excreción de xenobióticos (Reddy y Couvreur, 2009; Granados-Principal *et al.* 2012; Kelly, 1999; Ramírez-Torres y Gabás, 2010)

Es un compuesto que parece ser poco susceptible a la peroxidación lipídica y actúa como un desactivador de oxígeno singlete a nivel de la piel, protegiéndola de la exposición a los rayos ultravioletas y otras fuentes de radiación ionizante (Kelly, 1999).

El Monfalouti *et al.* (2010) señalan que las principales propiedades saludables del aceite de argán virgen podrían ser atribuidas a la presencia de polifenoles, tocoferoles y escualeno. Los escasos datos disponibles muestran que este compuesto puede aparecer en el aceite de argán virgen en cantidades superiores a otros aceites vegetales comestibles (Adlouni, 2010; Charrouf y Guillaume, 2010). Khallouki *et al.* (2003) indican una concentración media de 314 ± 1 mg de escualeno/100 g de aceite de argán.

▪ 2.2.4 Fitoesteroles.

Son sustancias de origen vegetal con una estructura química similar a la del colesterol. Están presentes en nuestra dieta habitual estimándose un consumo diario de entre 150 y 500 mg/día. Estos compuestos poseen una gran variedad de efectos fisiológicos beneficiosos para la salud. Estudios recientes han demostrado efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (Othman y Moghadasian, 2001; Moghadasian, 2002). La FDA y el European Scientific Committee on Food han reconocido sus efectos beneficiosos en las ECV, si bien las propiedades de los distintos fitosteroles no están aún bien documentadas.

Se les atribuyen propiedades bactericidas y fungicidas. El mayor efecto y mejor estudiado de estos compuestos es el de disminuir los niveles de colesterol, tanto colesterol total como c-LDL. Este hecho se encuentra perfectamente avalado por una gran literatura científica tanto en ensayos realizados en ratas como en humanos. Así, se ha podido comprobar cómo el consumo de margarinas enriquecidas en α -sitosterol, campesterol y estigmasterol producen reducciones de colesterol circulante de un 10% y de un 8 % de c-LDL sin afectar al contenido de c-HDL y triglicéridos (consumo medio de 1.5-2.2 g/día de fitoesteroles). Este efecto se debe a que

disminuyen la absorción de colesterol a nivel intestinal, disminuye la esterificación del colesterol, y estimulan el flujo de colesterol desde los enterocitos hasta el lumen intestinal (Rodríguez-Rivera, 2008).

En el aceite de argán, el contenido total de fitoesteroles oscila entre 150-290 mg/100 g siendo según Khallouki *et al.* (2003), el escotanol (\approx 140 mg/100 g) y el espinasterol (115 mg/100 g) característicos de esta especie vegetal. Destaca también la presencia de estigmasta-8,22-dien-3 β -ol, estigmasta-7,24-28-dien-3 β -ol y campesterol, que se encuentra en una concentración baja (0.3%) (Cabrera-Vique *et al.* 2012). Los estudios al respecto son muy limitados.

Estudios recientes indican que el escotanol y el espinasterol juegan un papel importante en enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson) y en la regulación cerebral de la homeostasis del colesterol (El Kharrassi *et al.* 2014).

▪ 2.2.5 Coenzima Q₁₀ y melatonina.

El CoQ₁₀ también conocido como ubiquinona es un compuesto liposoluble que desempeña importantes funciones fisiológicas. Es un potente antioxidante, actúa como estabilizador de membranas celulares protegiendo a las lipoproteínas del daño oxidativo y es un componente fundamental de la cadena respiratoria. También participa en la regeneración de otros antioxidantes como la vitamina E, y ha sido reconocido como un potente regulador de genes (Reiga *et al.* 2015). Se ha recomendado su suplementación en insuficiencia cardiaca, hipertensión y ciertas enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer (Pravst *et al.* 2010; Gutierrez *et al.* 2012).

La melatonina es una hormona que se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano (Kocadağlı *et al.* 2013). Además de mediar en el entramado de los ritmos circadianos y en el control del balance energético, presenta elevada capacidad antiinflamatoria y antioxidante por neutralización de radicales libres y estimulación de sistemas antioxidantes endógenos como glutatión y superóxido dismutasa (Acuña *et al.* 2011). Se encuentra en pequeña cantidad en mostaza, bayas de Goji, almendras, pipas de girasol, cardamomo, hinojo, cilantro, cerezas, nueces, vino, algunas frutas y verduras, entre otros alimentos Tan et al. 2014

En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en aceites de argán obtenidos tanto por el método “tradicional” como por el método “semi-industrial”, se encontraron valores de 20.2 ± 9.9 mg/kg de CoQ₁₀ y 60.5 ± 51.2 ng/kg de melatonina. No se detectó la presencia de CoQ₉. En el mismo estudio, los valores detectados en aceite de oliva virgen extra variedad *Picual* fueron de 84.2 ± 12.5 mg/kg y 30.8 ± 12.9 ng/kg, respectivamente (Venegas *et al.* 2011). Estos resultados demuestran una presencia relevante de CoQ₁₀ y melatonina en aceite de argán virgen, lo que podría suponer una contribución significativa a su actividad biológica.

▪ 2.2.6 Metales traza.

En los aceites vegetales comestibles, la fracción mineral más allá de influir en sus propiedades nutricionales, destaca porque algunos elementos como cobre (Cu), hierro (Fe), cromo (Cr) o manganeso (Mn), incluso en cantidades traza, pueden ejercer un papel negativo sobre la estabilidad del aceite, ya que actúan como catalizadores del proceso de oxidación, afectando a su valor nutricional y biológico y, por supuesto, a las características sensoriales del producto. Los lípidos insaturados son particularmente susceptibles de oxidación durante la obtención y conservación del aceite, bien por auto-oxidación o bien, por foto-oxidación. El mecanismo más común de oxidación es la formación en cadena, de radicales libres. Este proceso es retardado por los compuestos antioxidantes y acelerado por pro-oxidantes, como los metales traza.

El contenido en estos elementos suele ser superior en los aceites vírgenes (Cabrera-Vique *et al.* 2012). Bendini *et al.* (2006) indican que los metales pueden disolverse en el aceite como sales de ácidos grasos. Fe y Cu 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. 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; Choe y Min, 2006). El control de ambos elementos aparece como criterio de calidad para aceites de argán en la Norme Marocaine 08.5.090 Standard de 2003 (Ver **Tabla 1**), al igual que ocurre en los aceites de oliva, de orujo de oliva y otros

aceites vegetales comestibles según recoge la normativa europea (Commission of the European Communities, 2003) y la del Consejo Oleícola Internacional (COI) (2006).

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 y de aceite de argán debido a residuos de plaguicidas, fertilizantes, contaminación medioambiental, proceso de obtención y conservación, etc (Roca *et al.* 2001; Marfil *et al.* 2008). Los efectos tóxicos de este elemento, tan ubicuo y con elevada persistencia biológica aún a bajas concentraciones, son bien conocidos (Cabrera *et al.* 1995; Roca *et al.* 2001). También su control aparece como criterio de calidad en la Norme Marocaine 08.5.090 Standard (2003) y en las regulaciones europeas y del COI anteriormente referidas, para aceites de oliva y de orujo de oliva.

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 (Viladrich *et al.* 1986). Diversos estudios señalan que el poder catalítico del Cu es entre 50 y 100 veces superior al del Fe (Choe y Min, 2006). 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) estudian 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 α -tocoferol.

En un estudio previo, se detectaron niveles de Cu que oscilaron entre 160.40-695.70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en aceite de argán obtenidos mediante el método de extracción tradicional, y entre 158.35-385.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en obtenidos por el método semi-industrial excediendo todos los valores el límite máximo de 0,1 mg/kg establecido para el aceite de argán en la Norma Marroquí (Marfil *et al.* 2008). Los valores más elevados correspondieron a muestras obtenidas mediante el método tradicional. Armenta *et al.*

(2010) encuentran valores en aceite de argán que oscilan desde no detectables hasta 0.565 mg/kg. La presencia de Cu en el aceite de argán podría deberse a diversos factores como la composición del suelo donde crece el árbol, empleo de fertilizantes y sobre todo, a posibles contaminaciones durante el proceso de obtención y envasado del aceite .

La presencia de **hierro** en los aceites puede ser debida en gran medida, a los niveles en el suelo de cultivo y al pH del mismo, que puede modificar la absorción por la planta, y a la contaminación medioambiental (Zeiner *et al.* 2010). El proceso de extracción y de envasado del aceite, la maquinaria utilizada, etc. también puede contribuir de forma significativa a la cesión del metal (Mendil *et al.* 2009; Zeiner *et al.* 2010). El daño provocado por la presencia de Fe en los aceites afecta notablemente a la estabilidad y flavor del producto, ya que acelera la descomposición de los hidroperóxidos y además afecta a los compuestos fenólicos (por ejemplo, el ácido cafeico) disminuyendo la estabilidad del aceite y su potencial antioxidante (Choe y Min, 2006).

En el estudio anteriormente referenciado y efectuado por nuestro grupo de investigación, se detectaron concentraciones de Fe que oscilaron en aceites obtenidos por el método tradicional entre 0.75-4.05 mg/kg, y para el método semi-industrial entre 0.75-1.70 mg/kg. Dos muestras del total analizado (n=26) superaron el límite máximo establecido por la Normativa Marroquí de 3.0 mg/kg. Señalar también, que la variabilidad observada en las muestras obtenidas mediante el método semi-industrial (CV=30.53%) fue bastante inferior a los aceites obtenidos mediante el método tradicional (CV=70.33%) (Marfil *et al.* 2008). Datos similares aportan Armenta *et al.* (2010), con valores que oscilan entre 0.23-1.73 mg/kg.

Diversos autores indican que el proceso tecnológico de obtención de los aceites puede incrementar los niveles naturales de **romo** en la materia prima debido a la transferencia del elemento desde la maquinaria empleada, utensilios, contenedores, envases, etc. (Solinas *et al.* 1984; Di Battista *et al.* 1993). Este metal es ampliamente utilizado a nivel industrial, por ejemplo en materiales de acero inoxidable.

En nuestro estudio previo, las concentraciones de cromo oscilaron para el método de extracción tradicional entre 10.30-55.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un CV del 54.76% y para el método semi-industrial entre 10.00-48.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un CV del 59.06% (Marfil *et al.* 2008). Esta amplia variabilidad en los datos es sin duda, debida a la falta de estandarización del proceso, hecho que cada vez más se tiende a subsanar.

En cuanto al **manganeso**, concentraciones del orden de 0.6 ppm provocan una disminución del 50% en la resistencia de una grasa sometida a un ensayo acelerado de oxidación (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). El procesado del aceite y los niveles en suelo son los factores más determinantes en la presencia de este elemento en aceites vegetales.

En un estudio anterior, las concentraciones de Mn oscilan para el método tradicional entre 18.1-70.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y para el método semi-industrial entre 15.00-68.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas para ambos métodos de extracción (Marfil *et al.* 2008).

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. En los aceites vegetales comestibles, su presencia puede atribuirse al contenido en los suelos (concentraciones naturales y antropogénicas) y a la polución medioambiental. Sin embargo, la influencia de la tecnología alimentaria ha sido ampliamente descrita y es un factor adicional que hay que considerar. En el caso del aceite de argán, el empleo de piedras y materiales similares para la rotura manual del hueso, el empleo de contenedores y envases metálicos o de cerámica, etc. puede contribuir en gran medida, a la presencia de plomo en el aceite.

En el estudio efectuado por Marfil *et al.* (2008), los valores en los aceites obtenidos por el método tradicional oscilaron entre 28.50-450.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CV=119.79%). En las muestras de aceite de argán obtenidas mediante el método semi-industrial

fueron inferiores, entre 32.00-95.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CV=39.88%); destaca la alta variabilidad en el método tradicional.

A la vista de estos datos preliminares, hemos considerado oportuno determinar la presencia de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb en todas las muestras de aceite analizadas en esta memoria, como un parámetro de calidad importante y decisivo en la conservación, estabilidad, seguridad y valor biológico de cualquier aceite.

▪ 2.2.7 Otros compuestos minoritarios.

En el aceite de argán podemos encontrar otros componentes que se encuentran en muy pequeña cantidad pero que siguen contribuyendo positivamente en la composición de éste aceite. Así encontramos derivados de ácidos grasos como glicéridos (mono- y diglicéridos), triterpenos, alcoholes, y alcoholes alifáticos (El Abbassi *et al.* 2014). Se ha detectado también la presencia de carotenoides y xantofilas así como de una saponina triterpenoide denominada arganina, que aunque presenta propiedades anti-nutritivas y sensorialmente desagradables, se eliminan gracias al tostado de las semillas (Cayuela *et al.* 2008; Cabrera-Vique *et al.* 2012).

De los alcoholes triterpénicos que se han aislado en el aceite de argán destacan butirospermol, tirucalol y β -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 (Charrouf y Guillaume, 1999).

Los carotenoides ejercen importantes efectos protectores en patologías como el cáncer, las enfermedades del corazón y en la respuesta inmune (El Abbassi *et al.* 2014).

3. Propiedades antioxidantes

El estrés oxidativo aparece cuando el balance entre la producción de radicales libres y la defensa antioxidante del organismo se altera. Los sistemas de defensa del organismo (las enzimas catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa), así como un adecuado aporte de antioxidantes a través de la dieta, protegen a las células del ataque de los radicales libres. Los aceites vegetales contienen una gran variedad de

compuestos antioxidantes, entre los que se encuentran los polifenoles y los tocoferoles, como ya se ha comentado anteriormente. Ya que las propiedades antioxidantes están directamente relacionados con el efecto beneficioso de los alimentos en la prevención y tratamiento de multitud de patologías, es interesante investigar dichas propiedades en los aceites tanto *in vitro* como a nivel de respuesta celular (Rubio y Seiquer, 2002; Ruiz-Roca *et al.* 2011).

Para evaluar la capacidad antioxidante de un alimento *in vitro* se pueden aplicar diversos métodos, pero los más utilizados son aquellos que determinan la habilidad para neutralizar radicales libres (como los ensayos ABTS y DPPH) y el poder reductor (el método FRAP). Estos métodos han sido ampliamente utilizados para analizar las propiedades antioxidantes en diversos aceites, sobre todo en aceite de oliva (Samaniego *et al.* 2007; Espin *et al.* 2000).

Son muy escasos los datos sobre la capacidad antioxidante total del aceite de argán virgen Estudios de Marfil *et al.* (2011) demuestran una capacidad antioxidante superior a otros aceites vegetales. También se han encontrado resultados elevados en ensayos DPPH y ABTS realizados en diversas partes del fruto del argán (El Monfalouti *et al.* 2012).

Además del análisis *in vitro* de la capacidad antioxidante, es interesante evaluar las propiedades antioxidantes de los aceites a nivel celular, ya que la activación de los mecanismos antioxidantes celulares es un prerrequisito para ejercer un efecto antioxidante *in vivo*. El intestino es el primer sitio de acción de los agentes antioxidantes dietéticos y es, además, donde la peroxidación lipídica es altamente frecuente, ya que puede provenir de la oxidación de las membranas celulares y de los lípidos de la dieta (Ruiz-Roca *et al.* 2011). A este respecto, es conocido que la línea celular Caco-2 (células que en cultivo se diferencian en enterocitos maduros) es un modelo ideal para evaluar la respuesta fisiológica de los enterocitos al daño oxidativo y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En esta línea celular se han estudiado con éxito, los efectos antioxidantes de los polifenoles del aceite de oliva (Deiana *et al.* 2010), del β -caroteno (Bestwick y Milne, 1999) o de los productos de la reacción de Maillard (Ruiz-Roca *et al.* 2011). En cualquier caso, existe muy poca

información de la respuesta celular a los antioxidantes de los aceites alimentarios, y ninguna referente al aceite de argán.

Las células Caco-2, al tener las mismas características que los enterocitos maduros, permiten realizar estudios de absorción de nutrientes, tema en el que nuestro grupo tiene amplia experiencia (Rubio y Seiquer, 2002; Mesías *et al.* 2008). La absorción de los compuestos bioactivos de los aceites es condición indispensable para ejercer un efecto a nivel tisular.

3.1 Bioaccesibilidad de antioxidantes

La bioaccesibilidad se define como la cantidad o fracción de un nutriente que es liberada de la matriz de un alimento en el tracto gastrointestinal, convirtiéndose en disponible para ser absorbidas. Este proceso supone la transformación digestiva de los alimentos en componentes que están listos para ser absorbidos o asimilados por las células del epitelio intestinal (Carbonell-Capella *et al.* 2013).

Un concepto muy relacionado con el anterior es el de biodisponibilidad, que se define como la fracción de los nutrientes o de los compuestos ingeridos que es digerida, absorbida y metabolizada, alcanzando la circulación sistémica y aquellos lugares específicos donde pueden ejercer su acción biológica (Quiñones *et al.* 2012). Incluye la digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución tisular y bioactividad. Sin embargo, debido a las dificultades prácticas y éticas que se encuentran en la medición de la bioactividad, el término biodisponibilidad queda reducido generalmente a la fracción de un compuesto dado o su metabolito que llega a la circulación sistémica (Carbonell-Capella *et al.* 2013). Se puede determinar *in vivo* en animales o humanos mediante la medida del área bajo la curva (concentración en plasma) después de la administración de una dosis aguda o crónica de un compuesto aislado o contenido en un alimento (Rein *et al.* 2013).

En definitiva, la biodisponibilidad de un componente alimentario depende de la digestión, la liberación de la matriz alimentaria y de la posterior absorción por las células intestinales para ser transportado a los órganos corporales en los que ejerce sus funciones, mientras que la bioaccesibilidad sólo depende del proceso digestivo y la consecuente liberación de la matriz del alimento (Etcheverry *et al.* 2012). Actualmente,

existe un consenso general sobre la mayor utilidad de evaluar la bioaccesibilidad de un nutriente frente a la determinación de su contenido inicial en el alimento, ya que la disponibilidad para ser absorbido, más que su cantidad total, determinará su capacidad para ejercer una determinada actividad *in vivo*. Por tanto, el primer requisito para que un componente alimentario sea un potencial antioxidante *in vivo*, es que sea bioaccesible. El segundo requisito es que, además, mantenga su actividad, es decir, sus propiedades antioxidantes, una vez concluido el proceso de digestión (Dinella *et al.* 2007) La evaluación de la bioaccesibilidad se suele hacer *in vitro* mediante técnicas de digestión simulada. Ahora bien, para estudiar la biodisponibilidad lo ideal es la realización de ensayos *in vivo*, en los que, según el nutriente a estudiar, se pueden realizar estudios de balance -especialmente difíciles, sobre todo en humanos- y análisis en diversos tejidos o en plasma después de la administración de una dosis aguda o crónica del compuesto en cuestión, bien aislado o contenido en un alimento (Rein *et al.* 2013). Estos ensayos son normalmente muy laboriosos y costosos, y en ellos existen grandes variaciones individuales. Una alternativa válida para los estudios *in vivo* son los cultivos celulares, utilizando células de tipo intestinal que permiten el estudio de la absorción de los compuestos liberados durante el proceso de digestión (Mesías *et al.* 2009). La línea celular Caco-2, cuyas células en cultivo se diferencian en enterocitos maduros con todas las características propias del epitelio intestinal, son idóneas para el estudio de la biodisponibilidad de nutrientes, así como para analizar la actividad antioxidante de un determinado compuesto a nivel celular (Seiquer *et al.* 2008)

No siempre los polifenoles que se encuentran en mayor cantidad en un alimento, son necesariamente los más activos. La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, en formas que no se pueden absorber, sin embargo, durante el proceso de digestión, los polifenoles sufren diversas modificaciones que pueden alterar su bioaccesibilidad y posterior absorción (Quiñones *et al.* 2012). Por tanto, la determinación de los compuestos fenólicos en extractos químicos de los alimentos proporciona una información limitada, ya que algunos de estos compuestos pueden escapar al proceso estándar de extracción pero, sin embargo, ser liberados de la matriz alimentaria por las enzimas digestivas o sufrir

transformaciones hacia diferentes formas estructurales, lo cual alteraría su actividad (Saura-Calixto *et al.* 2007). Por tanto, el perfil en polifenoles de los diferentes aceites va a afectar a su capacidad para actuar como un antioxidante potencial tras la digestión (Dinella *et al.* 2007).

Existe muy poca información en la bibliografía referente al estudio de la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en aceites y de la estabilidad digestiva de sus propiedades antioxidantes (Dinella *et al.* 2007; Soler *et al.* 2010). La mayor parte de estos trabajos se han realizado con polifenoles individuales (bien aislados del alimento o sintetizados químicamente), y muy pocos con la fracción bioaccesible completa que resulta de la digestión del aceite. Sin embargo, hay evidencias que muestran que la biodisponibilidad de estos compuestos es sustancialmente diferente cuando derivan de una mezcla que cuando se presentan de forma individual, y más aún cuando están incluidos en una matriz alimentaria (Rubió *et al.* 2014). Por otra parte, se han realizado algunos ensayos en diferentes grupos de alimentos que confirman que la actividad antioxidante inicial de los alimentos se modifica durante el proceso de digestión (Pastoriza *et al.* 2011; Chen *et al.* 2014).

Aunque existen datos bibliográficos previos sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, no hemos encontrado ninguno relativo al aceite de argán, objeto de estudio de la presente Memoria. Por tanto, uno de los objetivos planteados por nuestro grupo de investigación, fue determinar la biodisponibilidad del contenido en polifenoles, tanto totales como individuales, así como de las propiedades antioxidantes, en el aceite de argán virgen extra.

4. Efectos saludables del consumo de aceite de argán virgen en prevención y/o tratamiento de distintas patologías

4.1 Enfermedades cardiovasculares

La grasa ingerida en la dieta es un factor clave en la prevención y tratamiento de las ECV. El perfil lipídico y la abundancia de compuestos antioxidantes en el aceite de

algún virgen, induce a pensar que su consumo puede ejercer un efecto positivo en este tipo de patologías.

Según la OMS, las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo y no sólo en países desarrollados ya que un 80% de los infartos se producen en países de economías medias o bajas. El amplio abanico de trastornos considerados como ECV incluye cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatías reumáticas y congénitas, trombosis venosas y embolias pulmonares. En la mayoría existe un proceso patológico común, que es la aterosclerosis, caracterizada por una acumulación de grasas, que dará posteriormente origen a placas de ateroma. Estas placas provocan un estrechamiento en los vasos sanguíneos y contribuyen a un mal funcionamiento de los mismos. La formación de la placa de ateroma está gobernada por procesos oxidativos, inflamatorios y necróticos. Parece claro que la inflamación es un factor común en obesidad, aterosclerosis y diabetes y por tanto, en el síndrome metabólico (Lusis 2000; Rocha y Libby, 2009).

Es conocido que niveles altos de LDL-c oxidadas son perjudiciales en el desarrollo de la aterosclerosis. Esta oxidación se produce bajo determinadas condiciones patológicas, tales como hiperlipidemia, estrés oxidativo o desórdenes genéticos (Mitra *et al.* 2011). Las LDL-c oxidadas son fagocitadas por macrófagos, originando las denominadas células espumosas que se depositan en la pared vascular y que conducen a lesiones ateroscleróticas, que pueden obstruir la luz arterial, desprenderse y originar un trombo y en última instancia, causar un infarto de miocardio (Miller *et al.* 2010).

La alimentación juega un papel primordial en las ECV; está muy recomendado el empleo de una terapia nutricional, no sólo como herramienta preventiva junto al ejercicio físico y un estilo de vida saludable, sino también como coadyuvante al tratamiento farmacológico, a fin de minimizar la necesidad de medicamentos. Entre otras pautas dietéticas es fundamental disminuir la ingesta de colesterol y grasa saturada (sustituyendo ésta por grasa insaturada) así como una ingesta adecuada de antioxidantes (Steinberg, 2002; Moghadasian, 2002; Hooper *et al.* 2011; Bulló *et al.* 2011).

En cuanto a la ingesta de ácidos grasos, su longitud y grado de insaturación determinan sus efectos metabólicos y su papel modulador en los niveles de colesterol sanguíneo y en el desarrollo de las ECV. Los AGMI, en especial el ácido oleico, presentan efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico ya que incrementan los niveles de HDL-c y disminuyen los de LDL-c y colesterol total. Además, aumentan la sensibilidad a la insulina y regulan los niveles de glucosa (Gillighan *et al.* 2011).

Las dietas con un contenido adecuado en AGPI de la serie $\omega 6$ no sólo disminuyen las concentraciones plasmáticas de LDL sino que no aumentan (o incluso algunos estudios demuestran que disminuyen) diversos factores de riesgo cardiovascular como son la presión sanguínea, marcadores de inflamación, parámetros homeostáticos y la obesidad. Estos beneficios, se incrementan cuando se reduce la ingesta de ácidos grasos saturados (Czernichow *et al.* 2010).

Parece ser que una dieta rica en antioxidantes también disminuye el riesgo cardiovascular; así lo indica un gran número de estudios epidemiológicos y diversos estudios de intervención en humanos como el Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) llevado a cabo en 2002. Estudios en humanos han demostrado que la vitamina E y los compuestos fenólicos extraídos de alimentos como aceite de oliva virgen extra, cacao, té o vino tinto, inhiben de forma significativa la oxidación de las LDL-c (Caruso *et al.* 1999; Coni *et al.* 2000; Vissers *et al.* 2001; Muñoz *et al.* 2010). También se han realizado estudios que examinan el efecto positivo de vitaminas E y C, coenzima Q, polifenoles y β -caroteno en las ECV (Muñoz *et al.* 2010).

El interés científico por los polifenoles en las ECV se ha centrado en su función frente a las ROS, tan relacionadas con ciertas enfermedades degenerativas. La equilibrada relación AGPI/AGMI que presenta el aceite de argán virgen y su alto contenido en agentes antioxidantes, se han citado como responsables de su efecto positivo. Aunque una fracción importante de los ácidos grasos del aceite de argán son AGPI $\omega 6$ y éstos son más susceptibles a la oxidación que otros AG, es posible que tal como se describe en bibliografía, su alto contenido en tocoferoles y su elevada capacidad antioxidante total puedan prevenir la peroxidación lipídica y la generación de peróxidos lipídicos en plasma.

Se han efectuado diversos estudios que relacionan el consumo de aceite de argán virgen con posibles beneficios en las ECV aunque no aportan suficiente información sobre la composición de los aceites de argán ensayados. Los más relevantes se describen a continuación.

Berrougui *et al.* (2003) estudiaron los efectos del aceite de argán virgen en el tratamiento de la hiperlipemia e hipercolesterolemia inducidas en ratas a través de una dieta hipercalórica y rica en colesterol, administrando 1 ml aceite/100 g de peso corporal durante 7 semanas. Observan una disminución del colesterol total ($\approx 37\%$), de LDL-c ($\approx 68\%$) y de los triglicéridos ($\approx 31\%$) mientras que no se modifican los niveles de HDL-c. En un trabajo posterior, estos autores realizaron estudios *in vitro* con extractos fenólicos del aceite de argán que muestran una inhibición de la oxidación de las LDL-c, actuando frente a especies reactivas de oxígeno en medios acuosos, como pueden ser el plasma y el fluido intersticial de la pared arterial (Berrougui *et al.* 2006).

Derouiche *et al.* (2005) realizaron un estudio en voluntarios con una dieta isocalórica y que ingerían 25 g/día de mantequilla durante un periodo de 2 semanas, cambiando la ingesta de mantequilla por 25 g/día de aceite de argán virgen durante 3 semanas en un grupo, y la misma cantidad de aceite de oliva virgen extra para el grupo 2. Los resultados mostraron que ambos aceites provocaban una reducción de los niveles de AGS en plasma y un incremento de HDL-c y Apo A-1. Los niveles plasmáticos de LDL-c y Apo B sólo disminuyeron con la administración del aceite de oliva virgen pero se observó una disminución de los triglicéridos con la administración de aceite de argán virgen.

Este mismo grupo de investigación, realizan el estudio con 62 consumidores con una ingesta media de 15 g/día de aceite de argán, frente a 34 no consumidores. Observaron una disminución estadísticamente significativa de los niveles plasmáticos de LDL-c y lipoproteína A (LpA), y un descenso de los triglicéridos, dienos conjugados y peróxidos lipídicos, junto a un mayor contenido de antioxidantes (α -tocoferol) demostrando así una modificación positiva del perfil lipídico en plasma y un efecto protector frente a la oxidación (Drissi *et al.* 2004).

Cherki *et al.* (2005) relacionan el consumo de argán virgen con un efecto antiaterogénico ya que favorece la actividad paraoxonasa y el *status* antioxidante. Sour *et al.* (2011) estudian en un grupo de sujetos sanos (n=20) los efectos de una suplementación con aceite de argán sobre el perfil lipídico en plasma, en comparación con un grupo control. Los individuos del grupo correspondiente a la intervención nutricional ingerían en el desayuno 15 g/día de aceite de argán durante 4 semanas. Al final del estudio se observó que este grupo presentaba mayores concentraciones de vitamina E y valores más bajos de LDL-c y triglicéridos en plasma; no se observó un aumento estadísticamente significativo de los valores de HDL-c respecto al grupo control.

No se han encontrado en bibliografía estudios en humanos sobre los efectos del aceite de argán a nivel de presión arterial, sí en modelos de experimentación animal observándose un cierto efecto hipotensor. Parece ser que disminuye la presión sanguínea en ratas hipertensas y mejora la disfunción endotelial (El Monfalouti *et al.* 2010). El contenido de ácido linoleico y α -tocoferol puede contribuir a explicar este efecto por su relación con el óxido nitroso (El Abbassi *et al.* 2014).

Últimas investigaciones parecen indicar que las concentraciones plasmáticas de TG constituyen un factor de riesgo cardiovascular independiente del colesterol y sus consecuencias fisiopatológicas pueden ser incluso más severas. Elevados niveles de TG se asocian en gran medida, al metabolismo posprandial de los alimentos ricos en grasa (Hyson *et al.* 2003). Se ha comprobado que la ingesta de grasas y aceites ricos en ácido oleico y/o en ácidos grasos ω -3 reducen la concentración y el tiempo de aclaramiento de los TG en sangre con respecto a grasa saturada (Abia *et al.* 2001; Park y Harris, 2003).

Niveles posprandiales elevados de TG están asociados a condiciones metabólicas relacionadas con la resistencia a la insulina, incluyendo obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (López *et al.* 2008; Damasceno *et al.* 2011). La grasa de la dieta también puede afectar a la homeostasis de la glucosa (Alipour *et al.* 2008; López *et al.* 2008).

Teng *et al.* (2011) efectuaron un estudio comparativo entre aceite de palma, de oliva virgen y grasa saturada animal evaluando los cambios posprandiales a nivel de lipemia (colesterol, triglicéridos y ácidos grasos), glucosa e insulina, citoquinas relacionadas con el proceso proinflamatorio (IL-6, TNF- α , IL-1 β) y leptina. Los resultados demuestran una influencia notable de la fuente lipídica sobre estos parámetros, que se corrobora también en los estudios realizados por Alipour *et al.* (2008), López *et al.* (2008) o Teng *et al.* (2011) y que han demostrado la influencia del tipo de grasa ingerida sobre la lipemia posprandial.

Una elevada y prolongada respuesta lipémica posprandial está asociada a un incremento del riesgo cardiovascular por varios mecanismos que implican la función endotelial, la inflamación, la resistencia a la insulina y el estrés oxidativo (López *et al.* 2011; Ortega *et al.* 2012).

4.2 Diabetes

No aparecen en bibliografía investigaciones en humanos sobre un posible efecto del consumo de aceite de argán virgen sobre la diabetes, sí algunos ensayos con animales de experimentación en los que se observa una disminución de los niveles sanguíneos de glucosa (Charrouf y Guillaume, 2010; Bellahcen *et al.* 2012).

En ratas, Bnouham (2008) comprueban que la administración vía intraperitoneal de aceite de argán (2.5 mg/kg) después de una ingesta oral de glucosa de 1 g/kg produce una reducción significativa de la glucemia, tanto en animales sanos como en animales en los que se ha inducido diabetes mellitus tipo 1, en comparación con un grupo control. Comprueban que se reduce significativamente la cantidad de glucosa absorbida a nivel de yeyuno.

En un estudio más reciente, Bellahcen *et al.* (2011) confirman que la administración oral de 2 ml/kg de aceite de argán durante 7 días consecutivos a ratas diabéticas provoca una reducción significativa de la glucemia. Parece ser que la ingesta concomitante de aceite de argán y de aceite de pescado sería favorable en el control de la diabetes (El Monfalouti *et al.* 2010).

Los efectos antidiabéticos asociados a la ingesta de aceite de argán virgen se atribuyen principalmente a su perfil lipídico y a su alto contenido en tocoferoles, que favorece la actividad antioxidante tisular (Cabrera-Vique *et al.* 2012). En particular, dietas con baja ingesta de α -tocoferol se han correlacionado con el desarrollo de diabetes tipo 1 y tipo 2, mientras que la suplementación con vitamina E es beneficiosa en diabéticos ya que se incrementa la sensibilidad a la insulina. Este hecho se ha constatado tanto para el α -tocoferol como para el γ -tocoferol (Azar *et al.* 2011; Gray *et al.* 2011). El ácido férulico también parece estar implicado en el efecto antidiabético del aceite de argán. Este compuesto fenólico ha manifestado efectos beneficiosos en modelos animales de diabetes tipo 1 y tipo 2, disminuyendo los niveles de glucosa en sangre y reduciendo el estrés oxidativo (Ohnishi *et al.* 2004; Cabrera-Vique *et al.* 2012).

4.3 Procesos cancerígenos

Utilizando cultivos celulares (i.e. líneas celulares DU145, LNCaP, PC3) y en estudios epidemiológicos se ha descrito una posible actividad antiproliferativa celular y anticancerígena del aceite de argán en el cáncer de próstata y en el cáncer de colon (Bennani *et al.* 2007; El Monfalouti *et al.* 2010; El Abbassi *et al.* 2014). Diversos investigadores atribuyen este efecto positivo al γ -tocoferol, compuesto abundante en el aceite de argán y que se manifiesta como un potente agente quimiopreventivo (Helzlsouer *et al.* 2000; Campbell *et al.* 2003; Drissi *et al.* 2006; Bennani *et al.* 2007).

También se ha comprobado que las saponinas presentes en el aceite de argán junto a los polifenoles y el escualeno contribuyen a disminuir la proliferación celular en el cáncer de próstata (El Abbassi *et al.* 2014). Por ejemplo, Bennani (2009) investiga el efecto de los polifenoles extraídos del aceite de argán sobre la proliferación celular en dos líneas celulares epiteliales de procedencia humana, observando una acción antiproliferativa dosis-dependiente.

Algunos estudios también apuntan al efecto antitumoral del espinasterol, uno de los fitosteroles más característicos y abundantes en esta especie vegetal (Adlouni, 2010).

En ensayos con ratas y ratones, se ha comprobado que el escualeno y los polifenoles del aceite de argán favorecen la excreción de xenobióticos (Kamimura *et al.* 1992) y que el escualeno ejerce un efecto protector frente al cáncer de piel (El Abbassi *et al.* 2014).

4.4 Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal es una patología cada vez más extendida en nuestro entorno y que acarrea graves problemas de salud. Los radicales libres se encuentran incrementados en los procesos inflamatorios y poseen un papel importante en su patogénesis ya que el intestino inflamado está expuesto al estrés oxidativo generado por la infiltración de neutrófilos y macrófagos en la lámina propia. Además, la defensa antioxidante se encuentra disminuida (Cabré y Gasull, 2010).

Nuestro grupo de investigación efectuó un estudio sobre su posible influencia en la enfermedad inflamatoria intestinal utilizando un modelo de inflamación intestinal en ratas (Marfil, 2008). Los resultados preliminares muestran un efecto positivo de la ingesta de aceite de argán virgen, similar al del aceite de oliva virgen. El efecto antiinflamatorio observado lo atribuimos en principio, a su alto contenido en antioxidantes, fundamentalmente γ -tocoferol, potente antioxidante con propiedades antiinflamatorias demostradas.

4.5 Respuesta inmune

Algunos ensayos bioquímicos muestran que el perfil en ácidos grasos del aceite de argán favorece la respuesta inmune, particularmente por la proliferación de linfocitos, de citoquinas y de otras células mediadoras en la inmunidad del organismo (El Abbassi *et al.* 2014). Un estudio efectuado en ratas por Benzaria *et al.* (2006) muestra que el efecto de la ingesta de aceite de argán es similar al del aceite de oliva virgen.

4.6 Otras patologías

A nivel de nutrición clínica, el interés sobre el aceite de argán y sus propiedades saludables se pone de manifiesto por ejemplo, en 3 patentes sobre emulsiones lipídicas para nutrición parenteral, preparación de alimentos para reducir los niveles de

colesterol sanguíneos y sobre alimentación de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Bensouda, 2008; Ertus *et al.* 2009; Moreno-Torres *et al.* 2010).

A nivel de dermocosmética, el aceite de argán ha demostrado además de interesantes propiedades como hidratante, un efecto protector, reparador y antienvjecimiento de la piel que se atribuye sobre todo al contenido en tocoferoles, polifenoles y a su composición en ácidos grasos. Previene el fotoenvejecimiento cutáneo y la acción negativa de la radiación ultravioleta, la destrucción del colágeno y la respuesta inflamatoria a factores externos. Tradicionalmente se le atribuyen propiedades beneficiosas frente a la secreción sebácea excesiva, el acné, la psoriasis y otras alteraciones de la piel, así como para el cuidado y la salud del cabello (Guillaume y Charrouf, 2011; El Abbassi *et al.* 2014).

Investigaciones efectuadas por El Babili *et al.* (2010) muestran que los extractos del fruto del argán pueden ser activos frente a la malaria, pero no se han realizado ensayos con el aceite.

5. Anafilaxis y toxicidad del aceite de argán virgen

En la actualidad no se conocen casos de toxicidad aguda o crónica derivada del consumo de aceite de argán virgen, consumido en los lugares de origen desde hace siglos.

Sólo en 2010 se describió un caso de alergia en un marroquí, que se atribuyó a una proteína de un peso molecular de 10kDa, presente en este aceite al igual que en el aceite de cacahuete y de sésamo (Astier *et al.* 2010). Esta proteína sería la responsable de la reacción anafiláctica mediada por la IgE. El proceso cursó con síntomas de rinitis, conjuntivitis, eritema y urticaria. Según diversos autores se trata de un caso aislado (El Abbassi *et al.* 2014).

6. Bibliografía

- Abia R, Pacheco YM, Perona JS, Montero E, Muriana FJG, Ruiz-Gutierrez V. The metabolic availability of dietary triacylglycerols from two high oleic oils during the postprandial period does not depend on the amount of oleic acid ingested by healthy men. *J Nutr* 2001, 31:59-65.
- Acuña D, López LC, Escamez G, López A, García JA, Reiter RJ. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease – A review. *Curr Top Med Chem* 2011, 11:221-40.
- Adlouni A. L'huile d'argan, de la nutrition à la santé. *Phytothérapie* 2010, 8:89-97.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol* 1984, 105:121-6.
- Agence de Développement Social – Royaume du Maroc. *Étude de qualité des huiles d'argane au Maroc*. Agadir, 2007.
- Aguilera MC, Mesa MD, De Luis DA. Nutrición y enfermedad cardiovascular. En: Gil A (Ed.) Tratado de Nutrición. Tomo IV. Nutrición Clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2010.
- Alipour A, Elte JW, Van Zaanen HC, Rietveld AP, Castro M. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 9:39-44.
- Armenta S, González A, De la Guardia M. Adulteration detection of argan oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Chem* 2010, 121:878-86.
- Astier C, El Alaoui-Benchad Y, Moneret-Vautrin DA, Bihain BE, Kanny G. Anaphylaxis to argan oil. *Allergy* 2010, 65:662-3.
- Azar M, Basu A, Jenkins AJ. Serum carotenoids and fat-soluble vitamins in women with type 1 diabetes and preeclampsia: a longitudinal study. *Diabetes Care* 2011, 34:1258-64.
- Badui-Dergal S. Química de los Alimentos. Editorial Pearson. México, 2006.
- Bellahcen S, Mekhfi H, Ziyat A, Legssyer A, Hakkou A, Aziz M, Bnouham M. Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. *Phytother Res* 2012, 26:180-5.
- 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.

- Bennani H, Drissi A, Giton F. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev* 2007, 31:64-9.
- Bennani H. Impact of argan oil on prostate cancer antiproliferative effect: study of polyphenols. *Rev Franco Lab* 2009, 416:23-6.
- Bensouda Y. Formulation of argan oil-based lipid emulsion for parenteral nutrition. Patent WO/2008/002116, 2008.
- 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.
- Berrougui H, Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero 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, 92:921-9.
- 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.
- Berrougui H, Ettaib A, Herrera MD, Alvarez de Sotomayor M, Bennani N, Hmamouchi M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol* 2003, 89:15-8.
- Bnouham M, Bellahcen S, Benalla W. Antidiabetic activity assessment of *Argania spinosa* oil. *J Complement Integr Med* 2008, 5:1-12.
- Botta G. Influencia de los revestimientos en la calidad del aceite. *Aliment Equipos y Tecnol* 1990, 6:61-4.
- Buege J, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 1978, 52:305-10.
- Bulló M, Lamuela-Raventos R, Salas J. Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oils as important sources of fat and antioxidants. *Curr Top Med Chem* 2011, 11:1797-810.
- Cabré E, Gassull MA. Nutrición en la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Gil A. (Ed.). Tratado de Nutrición. Tomo IV: Nutrición Clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2010.
- 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* 1995a, 159: 17-21.

- Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Lead and cadmium contamination in dairy products and its repercussion on total dietary intake. *J Agric Food Chem* 1995b, 43:1605-9.
- Cabrera-Vique C, Bouzas PR, Oliveras-López MJ. Determination of trace elements in extra virgin olive oils: A pilot study on the geographical characterization. *Food Chem* 2012a 134:434–9.
- Cabrera-Vique C, Marfil R, Giménez R, Martínez-Augustin O. Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil – an edible oil with potential as a functional food. *Nutr Rev* 2012b, 70:266-79.
- Cabrera-Vique C, Mesías M. Chromium and iron in duplicate meals at a university residence: daily intake and dialysability. *Brit J Nut* 2011, 105:1546–52.
- Campbell S, Stone W, Whaley S, Krishnam K. Development of gamma-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Crit Rev Oncol Hemat* 2003, 47:249-59.
- Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A Review. *Compr Rev Food Sci Food* 2013, 13:155-71.
- Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N, Fedeli E, Galli GL. Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins. *Nutr Metals Cardiovasc Dis* 1999, 9:102-7.
- Cayuela JA, Rada M, Pérez-Camino M, Benaissa M, Abdelaziz E, Guinda A. Characterization of artisanally and semiautomatically extracted argan oils from Morocco. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008, 110:1159-66.
- Charrouf Z, Guillaume D. Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels: a review. *J Ethnopharmacol* 1999, 67: 7-14.
- Charrouf Z, Guillaume D. L'huile d'argane. Composition et propriétés chimiques de l'huile d'argane. En: Kenny L, De Zborowski I (Eds.). Atlas de l'arganier. IAV Hanssan II. Rabat, 2007.
- Charrouf Z, Guillaume D. Should the Amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health?. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010, 50:473-7.
- Charrouf Z, Harhar H, Gharby S, Guillaume D. Enhancing the value of argan oil is the best mean to sustain the argan grove economy and biodiversity, so far. 2008. Article disponible sur le site <http://www.ocl-journal.org>.

- Cheftel LC, Cheftel H. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. Zaragoza, 1992.
- Chen GL, Chen SG, Zhao YY, Luo CX, Li J, Gao, YQ. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. *Ind Crop Prod* 2014, 57:150-7.
- Cherki M, Berrougui H, Drissi A, Adlouni A, Khalil A. Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases? A review. *Pharmacol Res* 2006, 54:1-5.
- 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* 2005a, 5:352-60.
- Cherki M, Drissi A, Derouiche A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A. Beneficial effects of enriched-argan oil diet in healthy men: influence on HDL fluidity and paraoxonase activity. *Atherosclerosis* 2005b, 6:51-4.
- Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis – An overview. *Free Radic Biol Med* 2000, 28:1815-26.
- Choe E, Min D.B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr Rev Food Sci Food* 2006, 5:169-86.
- Cilla A, González A, Tomás-Barberán F, Espín JC, Barberá R. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation cell cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chem* 2009, 114:813-20.
- COI (International Oil Council). Applicable trade regulations to olive oil and olive residue oil. No.3/Rev 2; 24 November, 2006.
- Commission of the European Communities. Regulation 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis.
- Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R. Protective effect of oleuropein, an olive biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 2000, 35:45-54.
- Czernichow S, Thomas D, Bruckert E. n-6 fatty acids and cardiovascular health: a review of the evidence for dietary intake recommendations. *Brit J Nutr* 2010, 104:788-96.

- Damasceno NR, Pérez-Heras A, Serra M, Cofán M, Sala-Vila A, Salas-Salvadó J, Ros E. Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 2011, 21:14-20.
- Deiana M, Corona G, Incani A, Loru D, Rosa A, Atzeri A, Melis P, Dessi A. Protective effect of simple phenols from extra virgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cell. *Food Chem Toxicol* 2010, 48:3008-16.
- Derouichi A, Chercki 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, 49:196-01.
- 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.
- Dinnela C, Minichino P, D Andrea AM, Moteleone E. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds from Extra-Virgin olive oils during in vitro-digestion. *J Agr food chem* 2007, 55:8423-9.
- Donaldson MS. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J* 2004, 3: 19-25.
- 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, 24:588-92.
- Drissi A, Girona J, Cherki M, Godas G, Derouiche A, El Messal M, Saile R, Kettani A, Sola 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.
- Drusch S, Mannino S. Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends Food Sci Technol* 2009, 20:237-44.
- EFSA Panel on Dietetics Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage, maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations, maintenance of normal blood pressure, "anti-inflammatory properties", "contributes to the upper respiratory tract health", "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract", and "contributes to body defences against external agents" pursuant to article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2000. *EFSA Journal* 2011, 9:2033-57.

- El Abbassi A, Khalid N, Zbakh H, Ahmad A. Physicochemical characteristics, nutritional properties, and health benefits of argan oil: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014, 54:1401-14.
- El Babili F, Bouajila J, Fouraste I. Chemical study, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity to human breast cancer cells (MC F7) of *Argania spinosa*. *Phytomedicine* 2010, 17:157-60.
- El Kharrassi Y, Samadi M, Lopez T, Nury T, El Kebbjaj R, Andreoletti P, El Hajj HI, Vamecq J, Moustaid K, Latruffe N, El Kebbjaj MS, Masson D, Lizard G, Nasser B, Cherkaoui-Malki M. Biological activities of Schottenol and Spinasterol, two natural phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, on murine microglial BV2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446:798-04.
- El Monfalouti H, Charrouf Z, Belviso S, Ghirardello D, Scursatone B, Guillaume D, Denhez C, Zeppa G. Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels). *Eur J Lipid Sci Technol* 2012, 114:446-52.
- El Monfalouti H, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z. Therapeutic potential of argan oil. A review *J Pharm Pharmacol* 2010, 62:1669-75.
- Ertus P, Leveugle C; Ertus P, assignee. Integration of the argan oil in food preparations, which is useful e.g. as seasoning on green salads or compounds and to reduce cholesterol level, comprises adding argan oil extracted from kernels of the argan tree, to the food France. FR 2926441 (A1). 2009 Jul 24.
- Espin, JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals. *J Agric Food Chem* 2000, 48:648-56.
- Etcheverry P, Grusak MA, Fleige LE. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc and vitamins B6, B12, D, and E. Review. *Front physiol* 2012, 3:317.
- Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol* 1984, 105:114-21.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Codex Alimentarius Commission. En: Codex Alimentarius Volume 8, Fats, Oils and Related Products. WHO. Roma, 1993. pp. 1-16.
- Frankel EN. Lipid oxidation. The Oily Press. Dundee, UK, 1998.
- Gharby S, Harhar H, Guillaume D, Haddad A, Matthäus B, Charrouf Z. Oxidative stability of edible argan oil: a two-year study. *LWT-Food Sci Technol* 2011, 44:1-8.

- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Int* 2007, 40:1107-21.
- Gillingham LG, Harris-Janž S, Jones PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids* 2011, 46:209-28.
- Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Ochoa-Herrera J, Perez-Lopez P, Pulido-Moran M, Ramirez-Tortosa MC. Squalene ameliorates atherosclerotic lesions through the reduction of CD36 scavenger receptor expression in macrophages. *Mol Nutr Food Res* 2012, 56:733-40.
- Gray B, Swick J, Ronnenberg AG. Vitamin E and adiponectin: proposed mechanism for vitamin E-induced improvement in insulin sensitivity. *Nutr Rev* 2011, 69:155-61.
- Guillaume D, Charrouf Z. Argan oil and other argan products: use in dermocosmetology. *Eur J Lipid Sci Technol* 2011, 13:403-8.
- Gutierrez F, Perez P, Delgado J, Yubero E, et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. *Age* 2012, 34:389-03.
- Harhar H, Gharby S, Kartah B, El Monfalouti H, Guillaume D, Charrouf Z. Influence of argan kernel roasting-time on virgin argan oil composition and oxidative stability. *Plant Foods Hum Nutr* 2011, 66:163-8.
- Helzlsouer KJ, Huang HY, Alberg AJ, Hoffman S, Burke A, Norkus EP, Morris JS, Comstock GW. Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. *J Nat Cancer Invest* 2000, 92: 2018-23.
- Hernández GA, Majem SL. Libro blanco de los omega 3. 2ª edición, editorial Panamericana. 2013
- Hilali M, Hilali M, Charrouf Z, 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.
- Hooper L, Summerbell CD, Thompson R, Sills D, Roberts FG, Moore H, Davey G. Reduced or modified dietary fat for the preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2011, 6(7):CD002137.
- Hyson D, Rutledge JC, Berglund L. Postprandial lipemia and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2003, 5:437-44.

- Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, Ames BC. γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr* 2001, 714-722.
- Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche S, Ames BC. γ -Tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:11494-99.
- Kamimura H, Koga N, Oguri K, 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.
- Kelly GS. Squalene and its potential clinical uses. *Altern Med Rev* 1999, 4:29-36.
- Khallouki F, Mannina L, Viel S, Owen RW. Thermal stability and long-chain fatty acid positional distribution on glycerol of argan oil. *Food Chem* 2008, 110:57-61.
- Khallouki F, Younos C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spiegelhalter B, Bartsch H, Owen RW. 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, 12:67-75.
- Kiritsakis A. El Aceite de Oliva. Ediciones Madrid Vicente. Madrid, 1992.
- Klipstein-Grobush K, Geleijnse JM, den Breeijen JH, Boeing H, Hofman A, Witteman JC. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr* 1999, 69:261-6.
- Kocadağlı T, Yılmaz C, Gökmen V. Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem* 2014, 153:151-56.
- López S, Bermúdez B, Ortega A, Varela LM, Pacheco YM, Villar J, Abia R, Muriana FJG. Effects on meals rich in either monounsaturated or saturated fat on lipid concentrations and on insulin secretion and action in subjects with high fasting triglyceride concentrations. *Am J Clin Nutr* 2011, 93:494-9.
- López S, Bermúdez B, Pacheco YM, Villar J, Abia R, Muriana FJG. Distinctive postprandial modulation of beta cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2008, 88: 638-44.
- López-Huertas E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res* 2010, 61:200-7.

- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000, 140:233-41.
- Marfil R, Cabrera C, Giménez R, Martínez O, Socorro O. Importancia nutricional, económica y cultural del aceite de argán (*Argania spinosa*). Colección Fundación Euroárabe de Altos Estudios. Alianza Grupo Género. Granada, 2009.
- Marfil R, Cabrera-Vique C, Giménez R, Bouzas P, Martínez O, Sánchez JA. Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: influence of the extraction method. *J Agric Food Chem* 2008, 56:7279-84.
- Marfil R, Giménez R, Martínez O, Bouzas PR, Rufián JA, Mesías M, Cabrera-Vique C. Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *Eur J Lipid Sci Technol* 2011, 113:886-93.
- Marfil R. Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*). Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2008.
- Marquez-Ruiz G. Oxidation in dried microencapsulated oils. En: Kamal-Eldin A. (Ed) Lipid oxidation Pathways. AOCS Press. Illinois, 2003.
- Matthäus B, Guillaume D, Gharby S, Haddad A, Harhar H, Charrouf Z. Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chem* 2010, 120:426-32.
- Mendil D, Uluozlü OD, Tuzen M, Soylak M. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. *J Hazard Mater* 2009, 105:724-8.
- Mercado-Mercado G, De la Rosa Carrillo L, Wall-Mendrano A, López Díaz JA, Álvarez-Parrilla E. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutr Hosp* 2013, 28:36-46.
- Mesías M, Seiquer I, Navarro MP. Influence of diets rich in Maillard reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *J Agr Food Chem* 2009, 57:9532-38.
- Miller YI, Choi SH, Frang L, Tsimikas S. Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem* 2010, 51:229-51.
- Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci* 2011, 342:135-42.
- Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci* 2002, 70:855-65.

- Moreno-Torres Herrera R. Olifarma, S.L., assignee. Olive-oil-based functional oils. ES and US patent.WO/2010/149815, 2010.
- 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.
- Muñoz Quezada S, Olza Meneses J, Gómez Llorente C. Compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal. En: Gil A (Ed.) *Tratado de Nutrición*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2010.
- Norme Marocaine (NM) 08.5.090. Huile d'argane, spécifications. Service de Normalisation industrielle marocaine. Rabat, 2003.
- Ohnishi M, Matuo T, Tsuno T. Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Aymice. *Biofactors* 2004, 21:315-9.
- Ortega A, Varela LM, Bermúdez B, López S, Abia R, Muriana FJG. Dietary fatty acids linking postprandial metabolic response and chronic diseases. *Food Function* 2012, 3(1):22-7.
- Othman RA, Moghadasian MH. Beyond cholesterol-lowering effects of plant sterols: clinical and experimental evidence of anti-inflammatory properties. *Nutr Rev* 2001, 69:371-82.
- Park Y, Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res* 2003, 44:455-63.
- Pastoriza S, Delgado-Andrade C, Haro A, Rufián-Henares J.A. A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chem*, 2011, 129, 4:1926-32.
- Perales S, Barberá R, Lagarda MJ, Farré R. Availability of iron from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by *in vitro* methods (solubility, dialisability) and uptake and transport by Caco-2 cells. *Food Chem* 2007, 102:1296-303.
- Pravst I, Zmitek K, Zmitek J. Coenzyme Q₁₀ contents in foods and fortification strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010, 50:269-80.
- Prevot A, Gente M, Morin O. Les progrès de l'absorption atomique et les corps gras. *Rev Franc Corps Gras* 1977, 24: 409-18.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp* 2012, 27:76-89.

- Rahmani M. Composition chimique de l'huile d'argane «vierge». Département des sciences alimentaires et nutritionnelles. Cahiers Agricultures vol. 14, n° 5, septembre-octobre 2005.
- Ramírez-Torres A, Gabás C, Barranquero C. Squalene: Current Knowledge and potential therapeutical uses. Universidad de Zaragoza, 2010.
- Ramirez-Tortosa MC, Quiles-Morales JL. Vitamina C, vitamina E y otros antioxidantes de origen alimentario. En: Gil A (Ed.) Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Editorial Acción Médica. Madrid, 2005.
- Reddy LH, Couvreur P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61:1412-26.
- Reiga M, Aristoy MC, Toldrá F. Sources of variability in the analysis of meat nutrient coenzyme Q10 for food composition databases. *Food Control*, 2015, 45:151-4.
- Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Brit J Clin Pharmacol* 2013, 75:588-602.
- Roca A, Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Contenido de plomo y cadmio en aceites de girasol. *Grasas Aceites* 2001, 52:229-34.
- Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2009, 6:399-409.
- Rodríguez-Rivera VM. Bases de la Alimentación Humana. Editorial Netbiblo, 2010.
- 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, 84:25-32.
- Rubio J, Seiquer I. Transport of amino acids from in vitro digested legume proteins or casein in Caco-2 cell cultures. *J Agric Food Chem* 2002, 50:5202-6.
- Rubió L, Macià A, Castell-Auví A, Pinent M, Blay MT, Ardévol A, Romero MP, Motilva M.). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chem* 2014, 149:277-84.
- Rufián-Henares JA, Delgado-Andrade C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Res Int* 2009, 42:394-400.

- Ruiz-Roca B, Navarro MP, Seiquer I. Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures: relationships with mineral absorption across Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 2008, 56:9056-63.
- Ruiz-Roca B, Navarro MP, Seiquer I. Effect of Maillard reaction products from glucose-lysine model systems on oxidative stress markers and against oxidative induction by hydrogen peroxide in Caco-2 cells. *J Food Nutr Res* 2011, 50:237-48.
- Salcedo C. Analysis of fats and oils. *Aliment Equipos y Tecnol* 1991, 10:52-65.
- Samaniego C, Quesada JJ, López H, López MC. β -carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in Picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *J Food Comp Anal* 2010, 23:671-6.
- Samaniego C, Quesada JJ, Troncoso AM, García-Parrilla MC, 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.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem* 2007, 101:492-501.
- Seiquer I, Navarro MP. Influencia de los productos de la reacción entre lípidos oxidados (4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal y 4,5 (E)-epoxy-2 (E)-decenal) y lisina sobre la útil. *Grasas Aceites* 2003, 50:350-7.
- Seiquer I, Ruiz-Roca B, Mesías M, Muñoz A, Galdó G, Ochoa J, Navarro MP. The antioxidant effect of a diet rich in Maillard reaction products is attenuated after consumption by healthy male adolescents. *In vitro* and *in vivo* comparative study. *J Sci Food Agric* 2008, 88:1245-52.
- Soler A, Romero MP, Macià A, Saha S, Furniss C, Kroon PA, Motilva MJ. Digestion, stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestine epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chem* 2010, 119:703-14.
- 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.
- Sour S, Belarbi M, Khaldi D, Benmansour N, Sari N, Nani A, Chemat F, Visioli F. Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *Brit J Nutr* 2011, 107:1800-5.
- Steinberg D. Atherogenesis in perspectiva: hipercolesterolemia and inflamation as partners in crime. *Nat Med* 2002, 8:1211-7.

- Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA. Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. *J Lipid Res* 1990, 31:1637-43.
- Tan D, Zanghi² BM, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin identified in meats and other food stuffs: potentially nutritional impact. *J Pineal Res* 2014, 57:213-8.
- Teng KT, Nagapan G, Cheng HM, Nesaretnam K. Palm olein and olive oil cause a higher increase in postprandial lipemia compared with lard but had no effect on plasma, glucose, insulin and adipocytokines. *Lipids* 2011, 46:381-8.
- Terés S, Barceló-Coblijn G, Benet M, Álvarez R, Bressani R, Halver J E, Escribá V P. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc Natl Acad Sci* 2008, 105:13811-6.
- Tomás-Barberán FA. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alim Nutri Salud* 2003, 10:41-53.
- Velasco J, Holgado F, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. Influence of relative humidity on oxidation of the free and encapsulated oil fractions in freeze-dried microencapsulated oils. *Food Res Int* 2009a, 42:1492-500.
- Velasco J, Dobarganes C, Holgado F, Márquez-Ruiz G. A follow-up oxidation study in dried microencapsulated oils under the accelerated conditions of the Rancimat test. *Food Res Int* 2009b, 42:56-62
- Velasco J, Marmesat S, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *J Agric Food Chem* 2006, 54:1722-9.
- Venegas C, Cabrera-Vique C, García L, Escames G, Acuña-Castroviejo D, López LC. Determination of coenzyme Q₁₀, coenzyme Q₉ and melatonin content in virgin argan oils: comparison with other vegetable edible oils. *J Agric Food Chem* 2011, 59:12102-8
- 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 Aceites* 1986, 37:77-80.
- Vissers MN, Zock PL, Leennen R, Roodenburg AJ, Van Putte KP, Katan MB. Effect of consumption of phenols from olives and extra virgin olive oil on LDL oxidizability in healthy humans. *Free Radic Res* 2001, 35:619-29.
- 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.

Zeiner M, Juranovic-Cindric I, Skevin D. Characterization of extra virgin olive oils derived from the Croatian cultivar Oblica. *Eur J Lipid Sci Tech* 2010, 112:1248-52.



III. DISEÑO

DEL

ESTUDIO



1. Muestras

1.1 Aceite de argán.

Se han analizado 7 marcas comerciales distintas de aceite de argán virgen etiquetadas como virgen extra. Todas fueron obtenidas por el método semi-industrial y por presión en frío, envasadas en botellas de vidrio y comercializadas *al detall* en España en tiendas especializadas. Todas ellas proceden de Marruecos, concretamente de la zona suroeste que se extiende al pie de las montañas del Alto Atlas y del Anti Atlas, que es la principal zona de producción de este aceite.

En la **tabla 2** se detalla toda la información aportada en el etiquetado de las muestras.

1.2 Otros aceites vegetales comestibles.

Se seleccionaron 11 tipos de aceites vegetales diferentes con el objeto de realizar un estudio comparativo frente al aceite de argán. Todos ellos están comercializados en España adquiridos en grandes superficies o en tiendas especializadas según el tipo de aceite.

El muestreo incluye:

- Aceite de oliva virgen extra variedad *Picual*
- Aceite de soja virgen
- Aceite de germen de trigo virgen
- Aceite de nuez virgen
- Aceite de almendra dulce virgen
- Aceite de sésamo virgen
- Aceite de aguacate virgen
- Aceite de pepita de calabaza
- Aceite de lino virgen
- Aceite de pepita de uva refinado
- Aceite de girasol alto oleico refinado

Una vez en el laboratorio, las muestras han sido conservadas adecuadamente, protegidas de la luz, a 4 °C y preservadas de cualquier contaminación hasta el momento de su análisis.

2. Control de calidad de las muestras

Aunque los aceites de argán adquiridos para la realización del estudio estuvieran etiquetados con la denominación aceite de argán virgen extra, se ha procedido a analizar los siguientes parámetros de calidad:

- Grado de acidez
- Índice de peróxidos
- Absorbancia en el UV (K_{232} y K_{270})
- Contenido en metales traza (Cu, Fe, Cr, Mn y Pb)

Todas estas determinaciones se realizaron conforme a los métodos oficiales de análisis de aceites vegetales comestibles recogidos en la legislación vigente (Reglamento CE 2568/91; Reglamento CE 796/2002).

Para la cuantificación de metales traza se ha aplicado la metodología optimizada en trabajos anteriores y que está basada en el análisis directo de las muestras diluidas con metil-isobutil-cetona por espectroscopia de absorción atómica electrotrémica (Marfil *et al.* 2008; Cabrera-Vique *et al.* 2012).

De igual forma se ha procedido con las muestras de otros aceites vegetales comestibles utilizados para el estudio comparativo.

En ambos casos, se descartaron las muestras que no respondían a los criterios de calidad establecidos en la correspondiente legislación para la categoría declarada en la etiqueta (norma marroquí en el caso del aceite de argán y normativa europea para el resto). Una de las muestras de aceite de argán fue descartada por no cumplir los criterios para la categoría virgen extra, todas las muestras de los otros aceites analizados cumplieron la normativa de calidad establecida. Las muestras seleccionadas parecen descritas en la **tabla 2**.

Tabla 2. Descripción de las muestras analizadas.

Procedencia	Marca comercial	Información en la etiqueta
Marruecos	Issahra	Aceite de argán gourmet virgen extra. Prensado en frío. Sabor tostado. Producto con certificado biológico por Qualité France SAS Paris. Envasado en Francia.
Marruecos	Wirgania	Aceite 100% puro, natural y orgánico. Tueste normal. Prensado en frío. Agricultura biológica y orgánica, certificado por Ecocert.
Marruecos	DARGAN	Aceite de argán tradición Berebere. Prensado en frío con almendras ligeramente tostadas.
Marruecos	Fée Maison	Aceite de argán 100% virgen puro. Certificado Bio Ecocert
Marruecos	Zamand'or	Agricultura orgánica. Tueste normal. Producto BIO de la región sur de Marruecos
Marruecos	Arganou	Aceite de argán 100% virgen extra. Agricultura orgánica, de origen montañoso. Comercio justo. Producto biológico certificado por el Istituto Mediterraneo di certificazione.
Marruecos	Lauralep	Aceite de argán 100% virgen extra. Agricultura orgánica. Prensado en frío. Certificado por Ecocert

3. Diseño experimental

A continuación se aporta un esquema general de todos los análisis y ensayos realizados tanto en las muestras de aceite de argán virgen y del resto de aceites vegetales comestibles incluidos en este estudio (**Figura 12**).

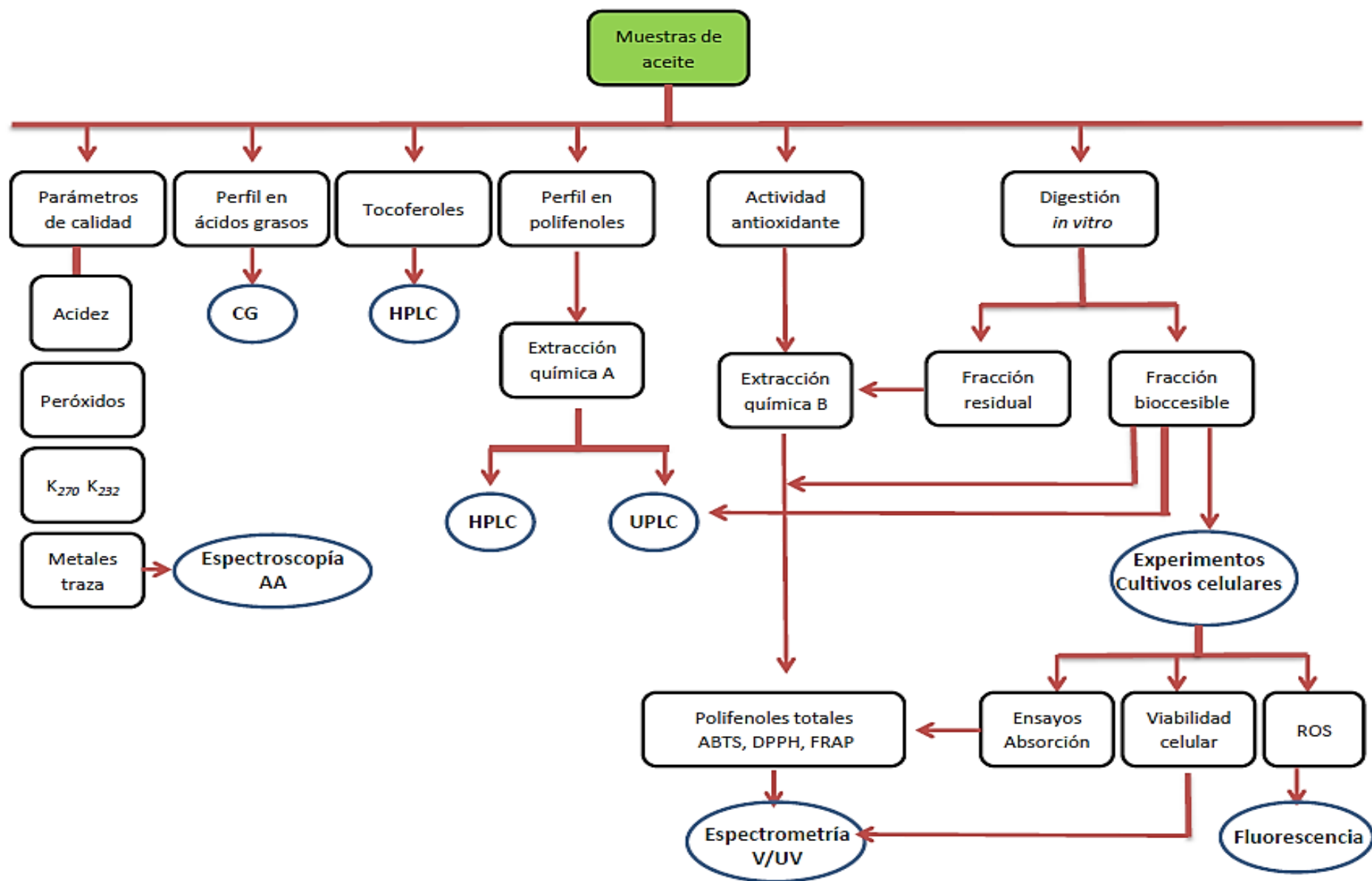


Figura 12. Esquema general de todos los análisis y ensayos realizados en los aceites.



ASPECTOS

METODOLÓGICOS



Todos los reactivos utilizados en los análisis, fueron de alto grado de pureza, y comprados a Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany), Panreac (Barcelona, España) y Fluka (Madrid, España).

1. Parámetros de calidad

Los parámetros de calidad de los aceites han sido determinados aplicando los métodos oficiales de análisis recogidos en 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, y sus posteriores modificaciones (Reglamento 796/2002, 1989/2003, 640/2008/61/2011).

Los métodos analíticos utilizados se han validado mediante material de referencia tal como se describe en Marfil, 2008.

1.1 Grado de acidez

Determina la cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite, expresado en porcentaje de ácido oleico, palmítico o laúrico. Si sólo se especifica acidez, se expresará en ácido oleico. La grasa biológicamente sintetizada es neutra, es decir, el aceite contenido en la aceituna sana que está en el árbol tiene 0 % de acidez libre. La presencia de ácidos grasos libres es por tanto una anomalía resultante entre otros factores, del mal estado de los frutos, mal tratamiento, o mala conservación de los mismos.

La acidez es un parámetro negativo para su empleo en la alimentación a partir de ciertos límites. Un índice de acidez muy bajo se corresponde con un aceite de alta calidad

▪ Descripción de la técnica

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

▪ Reactivos

- Mezcla de éter dietílico y etanol al 95% en proporción de volumen 1:1. Debe neutralizarse exactamente en el momento de su utilización con la solución de hidróxido potásico en presencia de la solución de fenolftaleína.
- Solución etanólica valorada de hidróxido potásico 0.1M o, en caso necesario 0.5M.
- Solución de 10 g/l de fenolftaleína en etanol de 95-96% (v/v).

▪ Instrumental

- Balanza analítica Mettler AE 200 (Zurich).

▪ Procedimiento

La grasa debe estar seca, desprovista de materia orgánica, por lo que se debe decantar el agua si la tuviera y en todo caso, filtrar sobre papel. Después se pesa en un erlenmeyer previamente tarado 10 gramos de aceite con precisión al cg, ya que se presupone una acidez comprendida entre 1 y 4 al tratarse de muestras de alta calidad. Se disuelve la muestra en 50 ml de la mezcla éter dietílico y etanol previamente neutralizado con la solución de fenolftaleína, y se valora agitando con la disolución de hidróxido potásico 0.1 M hasta viraje del indicador (color rosa persistente).

▪ Expresión de los resultados

La acidez, expresada en porcentaje de ácido oleico es igual a:

$$\text{Acidez (\%)} = (V \times c \times M) / (10 \times P)$$

Siendo:

- V: volumen en ml de la solución valorada de hidróxido potásico utilizada.
- c: concentración exacta, en moles por litro, de la solución de hidróxido potásico utilizada.

- M: peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (ácido oleico = 282 g/mol).
- P: peso en gramos de la muestra utilizada.

Se tomará como resultado la media aritmética de tres determinaciones.

1.2 Índice de peróxidos

El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en mili-equivalente de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas.

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; los antioxidantes, actúan retardándola, y otros como la luz, el calor (altas temperaturas o cambios bruscos de la misma), catalizadores orgánicos, trazas metálicas, humedad etc... las aceleran.

▪ Descripción de la técnica

La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico.

▪ Reactivos

- Cloroformo para análisis.
- Ácido acético glacial para análisis.
- Disolución de yoduro potásico recién preparada, exenta de yodos y yodatos.
- Disolución de tiosulfato sódico 0.01 N valorada.
- Disolución de almidón al 1%.

▪ Instrumental

Todo el material debe estar exento de sustancias reductoras u oxidantes

- Balanza analítica Mettler AE 200 (Zurich).

▪ Procedimiento

El ensayo se realiza con luz natural difusa o con luz artificial. Se pesa con precisión de 0.001 g en un vidrio de reloj (en su defecto en un matraz) una cantidad de muestra en función del índice de peróxidos que se presuponga, con arreglo a la tabla siguiente:

Tabla 3. Cantidades de muestra a pesar según el índice de peróxidos.

Índice de peróxidos que se presupone mEq O ₂ /kg	Peso de la muestra problema (g)
De 0 a 12	De 5.0 a 2.0
De 12 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

Una vez pesada la muestra, se agregan 30 ml de una mezcla de 3 volúmenes de ácido acético y un volumen de cloroformo (22.5 ml y 7.5 ml) agitando hasta total disolución de la muestra. Por último se adiciona 1 ml de solución saturada de yoduro potásico, y se tapa el matraz manteniéndose en agitación durante un minuto, y conservándolo después en la oscuridad durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo, se agregan 75 ml de agua y 1 ml de disolución de almidón, se agita vigorosamente y se valora el yodo liberado con disolución de tiosulfato 0.01 N hasta desaparición del color del complejo I₂-almidón.

▪ Expresión de los resultados

El índice de peróxidos (I.P.), expresado en mili-equivalentes de oxígeno activo por kg de grasa se calcula mediante la fórmula siguiente:

Siendo:

$$IP = (V \times N \times 100) / P$$

- V: ml de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en el ensayo, convenientemente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco.
- N: normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico empleada.
- P: peso en gramos de la muestra problema.

Se tomará como resultado la media aritmética de tres determinaciones.

1.3 Medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta (K_{270} y K_{232})

Proporciona indicaciones sobre la calidad de un aceite y su estado de conservación. También se utiliza para detectar los componentes anormales en el aceite de oliva virgen.

▪ Descripción de la técnica

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 extensiones 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%.

▪ Instrumental

- Cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor.
- Balanza analítica Mettler AE 200 (Zurich).
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible UV/VIS Perkin-Elmer Lambda 25 (Waltham, USA)

▪ Procedimiento

La muestra debe estar exenta de sustancias en suspensión. Se pesa con exactitud en un matraz aforado de 10 ml, 40 mg de aceite. Se disuelve en ciclohexano y se completa hasta el enrase. Utilizando ciclohexano como referencia, se mide la

extensión 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 repite la medida, bien diluyendo convenientemente, o bien procediendo a una nueva pesada.

▪ **Expresión de los resultados**

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

$$K_{\lambda} = L / (C \times E)$$

Siendo:

- 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.
- Se realizarán al menos 3 medidas y se calculará la media.

1.4 Metales traza

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 (ETA-AAS), 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

▪ **Descripción de la técnica**

Determinar por ETA-AAS la cantidad de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb en las muestras de aceite de argán virgen y en las de otros aceites vegetales comestibles, utilizando un método directo, sin mineralización previa de la muestra y puesto a punto por nuestro grupo de investigación (Marfil *et al.* 2008; Cabrera-Vique *et al.* 2012). 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.

▪ Reactivos

- Disolución estándar de cobre en aceite, 1 g/kg; 1l= 0.85 kg.
- Disolución estándar de hierro en aceite, 1 g/kg; 1l= 0.85 kg.
- Disolución estándar de cromo en aceite, 1 g/kg; 1l= 0.85 kg.
- Disolución estándar de manganeso en aceite, 1 g/kg; 1l= 0.85 kg.
- Disolución estándar de plomo en aceite, 1 g/kg; 1l= 0.85 kg.
- Metilisobutilcetona (MIBK).
- Agua bidestilada desionizada, sistema Milli-Q de Millipore (resistividad específica de 18 MΩ·cm).
- Ácido nítrico 65% (v/v), PA, ISO.

▪ 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, Fe, Cr, Mn, Pb.
- Balanza analítica con una precisión de 0.0001 g, Mettler AE-200 (Zurich).
- Estufa Selecta (Barcelona, España).
- Rotavapor Büchi R-110 (Barcelona, Madrid).

▪ Procedimiento

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, y se enjuaga abundantemente con agua bidestilada desionizada.

Se pesa con la mayor exactitud posible, 1 g de aceite previamente filtrado, en un matraz aforado y se diluye 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 y validadas para cada uno de los elementos (Marfil *et al.* 2008; Cabrera *et al.* 2012. Se efectuan los estudios previos para optimizar la cantidad de muestra y de disolvente. La **tabla 4** recoge las características analíticas del método para la determinación de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb, respectivamente.

Tabla 4. Características analíticas del método para la determinación de Cu, Fe, Cr, Mn y Pb por ETA-AAS

Metal	Línea de calibrado	Coefficiente de correlación	Límite de detección (pg)	Sensibilidad (pg)	Recuperación (x±SD, %):	Precisión (CV, %)
Cu	A= 0.027 + 0.012 {Cu, ng/ml}	0.9958 (α = 1%)	26.0	4.5	98.70±0.5	3.0-3.2 (determinaciones sucesivas) 4.1-4.7 (entre días)
Fe	A= 0.012 + 0.0273 {Fe, ng/ml}	0.9981 (α = 1%)	85	8.8	98.50±0.6	4.2-4.5 (determinaciones sucesivas) 5.0-6.3 (entre días)
Cro	A= 0.05 + 0.021 {Cr, ng/ml}	0.9990 (α = 1%)	1.0	3.0	98.15±0.20	3.50-4.20 (determinaciones sucesivas) 4.60-5.40 (entre días)
Mn	A= 0.025 + 0.011 {Mn, ng/ml}	0.9998 (α = 1%)	2.0	3.5	98.70±0.65	3.4-3.7 (determinaciones sucesivas) 4.0-5.2 (entre días)
Pb	A= 2.16x10 ⁻³ + 2.29x10 ⁻³ {Pb, ng/ml}	0.9965 (α = 1%)	4.0	10.0	98.80±0.80	2.8-3.6 (determinaciones sucesivas) 4.0-4.5 (determinaciones entre días)

2. Perfil de ácidos grasos

El análisis del perfil de ácidos grasos de los diferentes tipos de aceites analizados se realiza mediante cromatografía gaseosa, método físico que nos permite la separación de mezclas complejas posibilitando la identificación y cuantificación de los distintos tipos de componentes mediante el principio de retención selectiva.

▪ Descripción de la técnica

Para el análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases es necesario transformarlos previamente en sus derivados volátiles. Este proceso de derivatización, se realiza 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 de ácidos grasos en los aceites vegetales comestibles.

Este proceso se realiza según una adaptación de la normativa elaborada por el Consejo Oleícola Internacional del año 2001 para la preparación y obtención de ácidos grasos (COI/T.20/Doc. nº 24), y cuyos parámetros se evalúan en el artículo elaborado por Cert *et al.* (2000). Antes de la separación cromatográfica se procede a la extracción de los ésteres metílicos con n-hexano.

▪ Reactivos

- solución de metilato sódico 0.2 N.
- n-Hexano para cromatografía.
- Disolución de ácido sulfúrico al 4%.en metanol
- Disolución acuosa saturada de NaCl.
- Estándar mix de 37 ácidos grasos FAME 47885-U Supelco[®] (Sigma- Aldrich).

▪ Instrumental

- Balanza analítica Mettler AE 200 (Zurich).

- Cromatógrafo de gases modelo Autosystem (Pekin-Elmer, Norwalk, CT, USA) dotado con detector de ionización de llama e inyector convencional (**Figura 13**).
- Columna capilar Supelco SPTM 2380. Longitud: 30 m. diámetro interno: 0.25 mm. Espesor de película: 0.2 μ m.

▪ **Procedimiento**

Para preparar los ésteres metílicos se pesan 0.3 g de grasa y se agregan 5 ml de metilato sódico. Se coloca el refrigerante al matraz y se hierve hasta obtener una sola fase, como mínimo 5 minutos (**Figura 14**). A continuación se interrumpe la calefacción, se agregan al matraz 6 ml de sulfúrico en metanol y se vuelve a calentar manteniendo en ebullición durante 5 minutos. Enfriamos y 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, es la que se inyecta en el cromatógrafo. En la **tabla 5** se describen las condiciones del método cromatográfico.

Tabla 5. Condiciones del método cromatográfico para la determinación de ácidos grasos.

Temperatura del detector: 250°C Temperatura del inyector: 230°C Flujo gas portador: 20 ml/min Presión del gas portador (nitrógeno): 15 psi			
Programa del horno			
Etapa	T ^a , °C	t permanencia, min	Rampa
1	60	3	5 °C /min
2	170	9	10 °C /min
3	250	5	



Figura 13. Cromatógrafo de gases de la Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.



Figura 14. Obtención de los ésteres metílicos.

El orden en el que se registran los distintos ésteres metílicos de los ácidos grasos por el cromatógrafo es:

- ✓ 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).

▪ **Expresión de los resultados**

Para la identificación de los ácidos grasos se compararon los cromatogramas y los tiempos de retención de las muestras con los de la solución patrón de 37 ácidos grasos utilizada.

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del % de área, método ampliamente utilizado (O'Fallon *et al.* 2007; Ebrahimi *et al.* 2013), sumando todas estas áreas de los picos se obtiene el área total calculada:

$$\text{Área \%} = (\text{área individual} / \text{área total}) \times 100$$

3. Polifenoles

3.1 Totales: método de Folin Ciocalteau

▪ Descripción de la técnica

El análisis de los polifenoles totales se lleva a cabo utilizando el método de Folin–Ciocalteu (Singleton *et al.* 1999), que determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo (VI) a Mo (V). Como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul, cuya intensidad se determina mediante la medida espectrofotométrica de la absorbancia.

▪ Reactivos

- Reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Carbonato sódico anhidro: 75 g/l.
- Metanol al 50%, pH 2, ajustado con HCl 2N.
- Acetona al 70%.
- Ácido gálico: 200 mg/l.

▪ Instrumental

- Balanza analítica Mettler AE 200 (Zurich).
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS (Massachusetts, USA)
- Espectrofotómetro Victor™ X3 multilabel plate reader (Waltham, USA).
- Centrífuga Hettich Universal 320 (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Agitador shaker circular 3005 GFL® (Grossburgwedel, Alemania).

▪ Procedimiento

Previo al análisis, se requiere la obtención de un extracto sobre el cual procedemos a realizar la medida. Para la obtención del extracto químico se utiliza el siguiente procedimiento:

Se disuelven 250 mg de aceite en 2.5 ml de metanol/agua 1:1 (v/v) a pH 2 y se agita en vórtex durante 1 minuto. A continuación la mezcla se agita durante 1 hora en un agitador circular a 220 rpm a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se retira con cuidado a un matraz de 5 ml, y al residuo obtenido se le añadieron 2.5 ml de acetona al 70% repitiéndose todo el proceso anterior. Por último se recoge el sobrenadante, se mezcla con el extracto de metanol previamente obtenido y se enrasa a 5 ml de volumen final con agua Milli-Q (Saura-Calixto *et al.* 2006)

Una vez obtenido el extracto, en placas multipocillo de 96 pocillos se ponen 10 µl de la muestra problema, patrón o agua (blanco de reactivos), 6 pocillos para cada punto de la recta patrón y mínimo de 3 para cada muestra problema. Se añaden 10 µl de reactivo de Folin, se agita con cuidado y se deja reposar durante 3 minutos. Por último se añaden 200 µl de la solución de carbonato sódico y se ajusta el volumen a 250 µl con agua Milli-Q (30 µl). Se deja a temperatura ambiente durante 1 hora y se lee la absorbancia a 750 nm frente a una curva patrón de ácido gálico.

▪ **Expresión de lo resultados**

Los resultados para el contenido de polifenoles totales se expresan como equivalentes de ácido gálico (mg GAE)/kg frente una curva de calibración de ácido gálico, siendo el rango de la curva de calibración de 0 a 200 mg/l.

3.2 Individuales

Los polifenoles individuales se identifican mediante el uso de la cromatografía líquida, técnica de separación en la cual las muestras se disuelven en una fase móvil líquida (el disolvente) que pasa a través de una fase estacionaria inmisible que se mantiene fija dentro de la columna cromatográfica. La separación tiene lugar como

consecuencia de la distribución de los componentes entre la fase móvil y la estacionaria dependiendo de la afinidad por ambas fases.

En la presente Memoria se han utilizado dos técnicas para la detección y cuantificación de los compuestos fenólicos: cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y la cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC).

▪ 3.2.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

Para nuestros análisis se ha optado por un detector UV/VIS que es uno de los más utilizados en la identificación de polifenoles (Mullen *et al.* 2010; Gonthier *et al.* 2003). Se ha utilizado un detector UV/VIS de diodo en filas o también conocido como “diodo array detector” (DAD), que es capaz de adquirir espectros completos de absorción UV-Vis de los analitos que pasan a través de una celda de detección.

En general, los compuestos fenólicos presentan 2 bandas de absorción principales, la banda I que va de 300-380 nm y la banda II de 240-280 nm, sin embargo luego cada familia de compuestos posee su propia banda de absorción característica y que nos va a ser muy útil para el análisis cualitativo de las muestras (Abad-García *et al.* 2009).

▪ Reactivos

- Metanol para HPLC.
- n-Hexano para HPLC.
- Ácido galico.
- Ácido hidroxitirosol.

- Ácido dihidroxibenzoico.
- Ácido tirosol.
- Ácido hidroxibenzoico.
- Ácido hidroxifenilacetico.
- Ácido vainílico.
- Ácido cafeico.
- Ácido siríngico.
- p-vainillina.
- Ácido p-cumárico.
- Ácido ferúlico.
- Ácido o-cumárico.
- Vainillina.
- Oleoeuropeína.
- Quercetina.
- Luteonina.

▪ Instrumental

- Filtros de jeringas 0.45 µm Merck Millipore (Madrid, España).
- Balanza analítica Mettler AE 200 (Zurich).
- Agitador circular 3005 GFL® (Grossburgwedel, Alemania).
- Centrífuga Hettich Universal 320 (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Rotavapor Bunsen AO-400 (Madrid, España).
- Vórtex LSE™ series Corning (Hazebrouck, Cedex, Francia).
- Cromatógrafo líquido de alta eficacia Varian Pro Star equipado con una bomba binaria Varian 230, detector de diodo UV, inyector automático Varian

410 y módulo de acondicionamiento de la columna Varian 500 Teknokroma® (Barcelona, España).

- Columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm tamaño de partícula) Teknokroma® (Barcelona, España).

▪ Condiciones analíticas

La determinación de los compuestos polifenólicos individuales se lleva a cabo mediante el uso de la técnica establecida por Escarpa *et al.* (2002) con ligeras modificaciones. La fase móvil A consiste en una mezcla de H₂O/fosfórico al 1%, mientras que la fase móvil B es metanol. La velocidad de flujo es de 1 ml/min durante 60 minutos. Las fases móviles y las muestras se filtran previamente a través de una membrana de 0.45 micras, y se desgasifican por ultrasonidos antes de su uso para evitar que el relleno de la columna del aparato se obstruya. Después de esto, se inyectan 10 µl de extracto.

En la **tabla 6** se especifica el gradiente de elución utilizado.

Tabla 6. Gradiente de elución para la determinación y cuantificación de polifenoles.

Tiempo (min)	Caudal ml/min	% solvente A	% solvente B	% solvente C
Inicial	1	95	5	0
25	1	61	39	0
40	1	50	50	0
47	1	30	70	0
55	1	20	80	0
60	1	0	100	0

▪ Preparación de la muestra

El pre-tratamiento de la muestra de aceite es esencial para obtener los polifenoles lo más concentrados posible

Se realiza una adaptación de la técnica de Montedoro *et al.* (1992). En tubos de centrifuga de 50 ml se agregan 10 g de aceite y 10 ml de metanol al 80% (1:1 p/v). Después de permanecer 1 hora al agitador a 215 rpm, se centrifuga 15 minutos a 8000

rpm y se extrae el sobrenadante con una pipeta a un matraz aforado de 25 ml (protegiendo el sobrenadante de la luz en todo momento). Se vuelven a añadir 10 ml de metanol y se repite de nuevo la extracción.

Se ajusta el volumen a 25 ml de metanol al 80% y se evapora en el rotavapor hasta obtener un residuo gelatinoso de 0.5 ml. Finalmente se recoge el residuo en una mezcla de metanol al 80 % y se lleva a un matraz aforado de 5 ml y se conserva a -20°C hasta el momento de se análisis previa filtración (**Figuras 15 y 16**).



Figura 15. HPLC utilizado para la determinación de los compuestos fenólicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

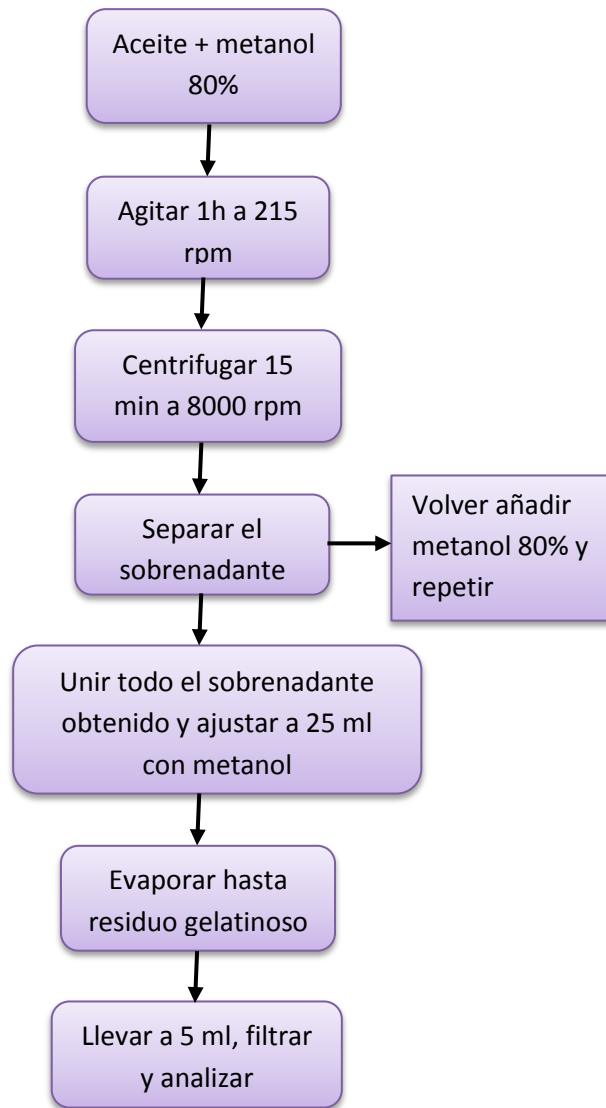


Figura 16. Esquema del proceso de obtención del extracto metanólico.

▪ Rectas de calibrado

Se utiliza la técnica del estándar externo. Para cada fenol se preparan soluciones madre de 1 mg/ml de cada uno de los estándares, y a partir de ellas, se diluyen en metanol disoluciones de concentraciones menores y crecientes a fin de construir las correspondientes curvas de calibrado para el componente a cuantificar. El principio de esta técnica es que la concentración de un producto es proporcional al área del pico cromatográfico correspondiente. A partir de las correspondientes ecuaciones de las

rectas obtenidas para cada fenol se procede a cuantificar el compuesto anteriormente identificado.

En la **tabla 7** se describen las rectas de calibrado obtenidas para éste método.

Tabla 7. Ecuaciones de regresión de las rectas de calibrado, % de recuperación y límites de cuantificación y detección.

Compuesto	Ecuación	Límite de detección (LOD) (µg/kg)	Límite de cuantificación (LOQ) (µg/kg)	Recuperación (%)
Quercetina	$y = 194454x - 335974$	5.40	18.0	98.1
Oleuropeina	$y = 34917x - 67875$	5.44	18.1	100
Luteolina	$Y = 309028x - 702392$	8.47	28.2	98.3
Ácido siríngico	$y = 300780x - 1E+06$	6.15	20.5	96.4
Ácido ferúlico	$y = 330663x + 379042$	7.12	23.7	98.2
Ácido cafeico	$y = 637289x - 10^{-b}$	7.01	23.3	98.1
Ácido gálico	$y = 642659x + 88669$	9.42	31.4	96.3
Ácido vaníllico	$y = 422480x - 988891$	29.5	98.5	99.4
Ácido o-cumárico	$y = 490644x - 10^6$	6.43	21.4	96.9
Ácido p-cumárico	$y = 852006x - 863357$	19.1	63.8	98.4
Ácido dihidroxibenzoico	$y = 313665x - 787896$	24.2	80.7	99.8
Ácido hidroxifenilacético	$y = 120118x - 502152$	21.3	71.2	96.4
o-Vanillina	$y = 156614x - 346301$	4.27	14.2	97.9
Tirosol	$y = 76673x - 219003$	16.7	55.7	97.4
Ácido hidroxibenzoico	$y = 314814x - 251369$	8.61	28.7	97.4
Hidroxitirosol	$y = 220783x - 619118$	16.6	55.4	98.1
Pinoresinol	$y = 128457x - 579875$	19.9	66.4	96.4
p-vanillina	$y = 399450x - 519932$	3.30	11.0	97.8

La recuperación (%) se calcula como el porcentaje de una cantidad conocida de patrón añadido a un aceite vegetal refinado.

▪ **Expresión de los resultados.**

Los resultados se expresan como mg/kg de aceite.

▪ **3.2.2 Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)**

La determinación de la cantidad de polifenoles que se encuentra presentes tras un proceso de digestión *in vitro* se determinó mediante el uso de técnicas avanzadas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS), con analizador de masas de triple cuadrupolo y monitorización de múltiples reacciones (MRM) (**Figura 17**).



Figura 17. Espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo del centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Debido a la necesidad de poder detectar cantidades muy pequeñas de compuestos polifenólicos en los digeridos de los aceites que no podrían ser detectados por la técnica de HPLC, se utiliza La espectrometría de masas, la cual nos permite obtener una elevada sensibilidad y especificidad. Permite realizar separaciones utilizando columnas llenas de partículas de pequeño tamaño y un sistema

cromatográfico que opera a muy altas presiones. Esto conduce a un menor tiempo de análisis, mayor eficiencia de pico, y mayor resolución (Wilson *et al.* 2005).

El acoplamiento de la espectrometría de masas a la cromatografía líquida nos permite además de separar los analitos mediante la utilización de ésta técnica, una segunda separación de los mismo utilizando su masa/carga (m/z). Para poder acoplar ambas técnicas y permitir que las sustancias a analizar pasen a fase gaseosa, se ha utilizado un sistema de ionización por electrospray (ESI), utilizado en muchos casos para la determinación de compuestos polifenólicos ya que es un sistema eficaz en el análisis de compuestos polares, lábiles y/o con bajo peso molecular (Borras-Linares, 2013).

Se ha utilizado un detector que aísla la especie iónica primaria (padre o ión precursor), lo fragmenta en iones adicionales (iones hijo o productos), y supervisa uno o más de estos iones de productos. La espectrometría de masas en tandem puede ser usada para cuantificación. Se utiliza la técnica conocida como múltiple reacción monitoreada (multiple reaction monitoring, MRM) que es capaz de alcanzar altos niveles de especificidad (Hernández, 2007).

En cuanto al analizador, se utiliza el cuadrupolo. Se compone de 4 barras alargadas en formación cuadrada, conectadas eléctricamente entre sí, en pares opuestos (Hoffmann *et al.* 2001).

▪ Reactivos

- Metanol LC-MS Ultra CHROMASOLV®.
- Acetonitrilo LC-MS Ultra CHROMASOLV®.
- Ácido gálico.
- Ácido dihidroxibenzoico.
- Tirosol.
- Ácido didroxifenilacetico.
- Ácido vainíllico.

- Ácido cafeico.
- Ácido siríngico.
- Ácido p-cumárico.
- Ácido ferúlico.
- Ácido o-cumárico.
- Vainillina.
- Oleoeuropeína.
- Quercetina.
- Luteonina.

▪ Instrumental

- Filtros Vivaspín 2 ml Sartorius (Alcobendas, Madrid, España).
- Filtros de jeringas 0.45 µm Merck Millipore (Madrid, España).
- Balanza analítica Mettler AE 200 (Zurich).
- Agitador circular 3005 GFL® (Grossburgwedel, Alemania).
- Centrífuga Hettich Universal 320 (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Rotavapor Buchi R-215 (Suiza).
- Vórtex LSE™ series Corning (Hazebrouck, Cedex, Francia).
- Cromatógrafo ACQUITY UPLC H-Class con UV y detector de MS Waters (Barcelona, España).
- Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo XEVO TQ-S Waters (Barcelona, España).
- Columna ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm tamaño de partícula) Waters (Barcelona, España).

▪ Condiciones analíticas

La determinación de los polifenoles presentes tanto en el extracto metanólico concentrado del aceite, como en el extracto obtenido tras un proceso de digestión *in vitro*, se lleva a cabo mediante las condiciones cromatográficas establecidas por Goh *et al.* (2011).

La separación cromatográfica se realiza usando un gradiente de elución con agua + 0.5% de ácido acético como eluyente A y acetonitrilo + ácido acético al 0.5% como eluyente B. La velocidad de flujo fue de 650 μl /min, la columna se mantuvo a 45 ° C y el volumen de inyección fue de 10 μl . Las Condiciones de se especifican en la **tabla 8**.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos.

Tiempo (min)	Caudal ml/min	% solvente A	% solvente B
Inicial	1	99	1
1	1	99	1
10	1	70	30
12	1	5	95
12.1	1	99	1
15	1	99	1

El análisis de espectrometría de masas se lleva a cabo utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo XEVO TQ-S. El instrumento funciona utilizando electrospray (ESI) de ionización en el modo de ion negativo. La adquisición de datos se realiza utilizando el software MassLynx 4.1 con el programa QuanLynx (Waters, Barcelona, España). Para la detección por MS/MS, los parámetros de la fuente de ionización en el modo negativo son los siguientes: el voltaje capilar se fija en 2.00 kV y el cono en 10 V; la temperatura de la fuente es de 100 °C y la de desolvatación de 300 °C. El gas del cono y de desolvatación utilizado es nitrógeno y se fijan caudales de 150 y 500 l/h, respectivamente. Las rectas de calibrado obtenidas y el límite de detección y cuantificación para cada compuesto fenólico se muestran en la **tabla 9**.

▪ Tratamiento de las muestras

El proceso de obtención del extracto metanólico para la determinación de los polifenoles en el aceite es el mismo que se explica en el apartado anterior para el HPLC con algunas modificaciones (**Figura 16**):

- La cantidad inicial de aceite de partida es de 15 g.
- Una vez se realizado el proceso de extracción 2 veces, el volumen no se ajusta a 25 ml, se mide lo obtenido y se evapora directamente hasta residuo gelatinoso. Finalmente se disuelve en 5 ml de acetonitrilo y se filtra para su inyección.

El software IntelliStart™ se utiliza para desarrollar el método de MRM (monitorización de reacción múltiple) para los 14 compuestos fenólicos. Se preparan soluciones estándar de 10 mg/l de cada compuesto fenólico y son infundidos en el aparato con un caudal de 10 µl/min en primer lugar, y luego se combinan con el flujo de la fase móvil. La tensión de la colisión se optimiza, así como la selección de la transición más sensible para la cuantificación. Aunque, algunos compuestos fenólicos tienen el mismo tiempo de retención, pueden ser identificados porque tienen diferentes cuantificación y confirmación de transiciones. La cuantificación de las muestras se realiza mediante el cálculo frente a una curva de calibración para cada uno de los analitos.

Tabla 9. Parámetros obtenidos para el método cromatográfico utilizado.

Compuesto	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ecuaciones	r^2	Recuperación (%)
Ácido gálico	0.14	0.47	$Y=510255X-43456.9$	0.9901	96.5
Ácido 3, 4-dihidroxibenzoico	0.09	0.31	$Y=11961.3X-819.205$	0.9953	99.0
Tirosol	0.09	0.31	$Y=2156.5X-157.84$	0.9958	97.8
Ácido hidroxifenilacético	0.07	0.24	$Y=149507X-11517$	0.9972	96.4
Ácido vanílico	0.10	0.34	$Y=30266.7X-2551.55$	0.9948	99.2
Ácido cafeico	0.07	0.22	$Y=792138X-57835.7$	0.9987	98.3
Ácido siríngico	0.05	0.17	$Y=105523X-7423.28$	0.9987	96.6
Vanillina	0.07	0.25	$Y=68054.1X-5533.4$	0.9971	97.7
Ácido p-cumárico	0.11	0.39	$Y=31614.3X-3039.84$	0.9932	98.4
Ácido ferúlico	0.08	0.26	$Y=2830.29X-317.702$	0.9969	98.0
Ácido o-cumárico	0.11	0.39	$Y=31681.8X-3026.2$	0.9931	97.0
Oleuropeina	0.02	0.08	$Y=4460.53x-99.2215$	0.9996	99.8
Luteolina	0.09	0.31	$Y=844.10X-88.224$	0.9956	98.5
Quercetina	0.26	0.86	$Y=30.596x-7.474$	0.9848	98.3

▪ Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aceite.

4. Tocoferoles

▪ Descripción de la técnica

Los tocoferoles se han determinado según la norma UNE-EN ISO 9936:2007 “Determinación del contenido de tocoferol y tocotrienol mediante cromatografía líquida de alta resolución”. Se determinan las fracciones α , β , γ y δ en aceites vegetales comestibles mediante HPLC.

▪ Reactivos

Todos los reactivos utilizados son de calidad adecuada para HPLC.

- Patrones de α , β , γ y δ - tocoferol.
- Metanol.
- n-hexano.
- Isopropanol.
- Fase móvil para HPLC: 99.5% hexano y 0.5% isopropanol.

▪ Instrumental

- Sistema HPLC, compuesto por una bomba de alta presión Waters 2695 (Barcelona, España), un detector de fluorescencia con longitud de onda establecida a 290 nm y emisión de longitud de onda a 330 nm Alliance (Barcelona, España).
- Columna analítica HPLC, 250 nm x 4 mm, con micropartículas de sílice con un tamaño de partícula de 5 μm Lichrosob SI 60 Waters (Barcelona, España).
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible UV/VIS Perkin-Elmer Lambda 25 (Waltham, USA)
- Rotavapor Bûchi R- 110 Bûchi (Barcelona, Madrid).

▪ Preparación de la muestras

Se prepara una disolución “madre” de cada uno de los tocoferoles pesando 10 ± 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 10**.

Tabla 10. Factores de división para el cálculo de la concentración de tocoferoles.

Longitud de onda (nm)	Tocoferol	Factor de división
292	α -Tocoferol	0.0076
296	β -Tocoferol	0.0089
298	γ -Tocoferol	0.0091
298	δ -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 contuviese 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 μl de la disolución patrón, ajustando la velocidad para conseguir las siguientes condiciones:

- Tiempo de retención de α -tocoferol: entre 8 y 12 minutos.
- Factor de resolución (RF), para la separación del β - y γ -tocoferol no inferior a 1.0; el RF se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$RF = (d_r (I) - d_r (II)) / (0.5 * [b (I) + b (II)])$$

Siendo:

- $d_r(I)$: distancia de retención del γ -tocoferol.
- $d_r(II)$: distancia de retención del β -tocoferol.
- $b(I)$: anchura de la base del pico del γ -tocoferol.
- $b(II)$: anchura de la base del pico del β -tocoferol.

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

Dependiendo de la concentración de tocoferoles, se pesan con una aproximación de 1 mg, 0.25 ± 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.

A continuación, se inyectan 10 μ 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 α -tocoferol, W , de la muestra, expresado en mg/kg, se obtiene por la fórmula:

$$W = (P \times A_t \times V) / A_s \times m$$

Siendo:

- P : concentración de α -tocoferol de la disolución patrón, en microgramos por mililitro.
- A_t : media de las áreas de los picos obtenidos con el patrón de α -tocoferol.

- A_3 : media de las áreas de los picos de α -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 se calcularon de la misma manera.

5. Digestión “*in vitro*”

▪ Descripción de la técnica

Los métodos *in vitro* pretenden simular la digestión de los alimentos en el estómago y duodeno de los monogástricos. Consisten en colocar el alimento en un recipiente adecuado, añadirle una solución clorhídrica de pepsina (que simula el jugo gástrico) e incubar en anaerobiosis a 37 °C durante 2 horas; posteriormente se añade una solución básica de pancreatina y sales biliares (que simula el jugo intestinal) y se incuba durante 2 horas. La cantidad de nutriente que se solubiliza durante la incubación es una estimación de la fracción bioaccesible. Para el proceso de digestión *in vitro* de los aceites, se ha llevado a cabo la técnica descrita por Laparra *et al.* (2008) con pequeñas modificaciones.

▪ Reactivos

- HCl 0.1 N, 1 N y 6 N.
- Pepsina (Sigma, P-7000).
- NaHCO_3 1 M.
- Pancreatina (Sigma, P-1750).
- Sales biliares (Sigma, B-8756).
- HEPES (Sigma H-4034).
- Polietilenglicol (PGE).

▪ Aparatos

- Balanza analítica Mettler AE-200 (Mettler Instrument, Zurich).

- Sonicador VCX 130 (Vibracell sonics Newtown, USA).
- Medidor de pH Basic 20 (Crison, Barcelona, España).
- Baño agitador con termostato BTG (Bunsen, Madrid, España).
- Ultracentrífuga Sorvall RC 6 plus (Thermo scientific, Madrid, España).
- Centrífuga Hettich zentrifugen Universal 320 (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Liofilizador LyoQuest Telstar (Madrid, España).
- Vórtex LSE™ series Corning (Hazebrouck Cedex, Francia).
- Osmolarímetro Osmomat 030-D (Berlín, Alemania).
- Filtros Vivaspin 2 ml Sartorius (Alcobendas, Madrid, España).

▪ Preparación de reactivos

- Pepsina: se prepara una disolución 0.8 g/5 ml HCl 0.1 N. Se añaden 0.05 g pepsina/g de muestra:
- Solución pancreatina/sales biliares: 0.1 g pancreatina y 0.0625 g sales biliares /25 ml de NaHCO₃ 0.1 M. Se añaden 2.5 ml/g muestra.

▪ Procedimiento

En tubos de centrífuga de 50 ml se pesa 1 g de aceite y se adicionan 9 ml de agua Mili-Q. Se agita en vórtex y se sonica 60s, 2 veces (teniendo siempre la precaución de mantener la muestra en hielo para evitar el efecto de la temperatura). A continuación, se ajusta el pH próximo a 2 con HCl 1 N y se añade la pepsina, tras lo cual los tubos se incuban en baño de agua a 37 °C, durante 2vh en agitación a 110 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo, los digeridos se introducen durante 10 minutos en baño de hielo, con la finalidad de interrumpir la actividad enzimática, y se ajusta el pH a 6 con NaHCO₃ 1 M.

Para la digestión intestinal, se añade la solución de pancreatina/sales biliares, se ajusta el pH a 7 con NaHCO₃ 1 M (siempre sonicando previamente entre paso y paso) y se incuban las muestras a 37 °C, durante 2 h con agitación a 110 rpm. Una vez finalizada la digestión, las muestras se calientan en baño de PEG 4- 5 minutos a 100 °C

para la inactivación enzimática, y finalmente se ponen en hielo durante 10 minutos para detener el proceso. A continuación, se centrifugan a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se separa el sobrenadante o fracción bioaccesible de la parte residual (**Figura 18**), cuyo volumen se anota. Ambas fracciones se conservan a -80 °C gaseadas con nitrógeno. Se ofrece un esquema de todo el proceso en la **figura 19**.



Figura 18. Separación del sobrenadante de la parte residual.

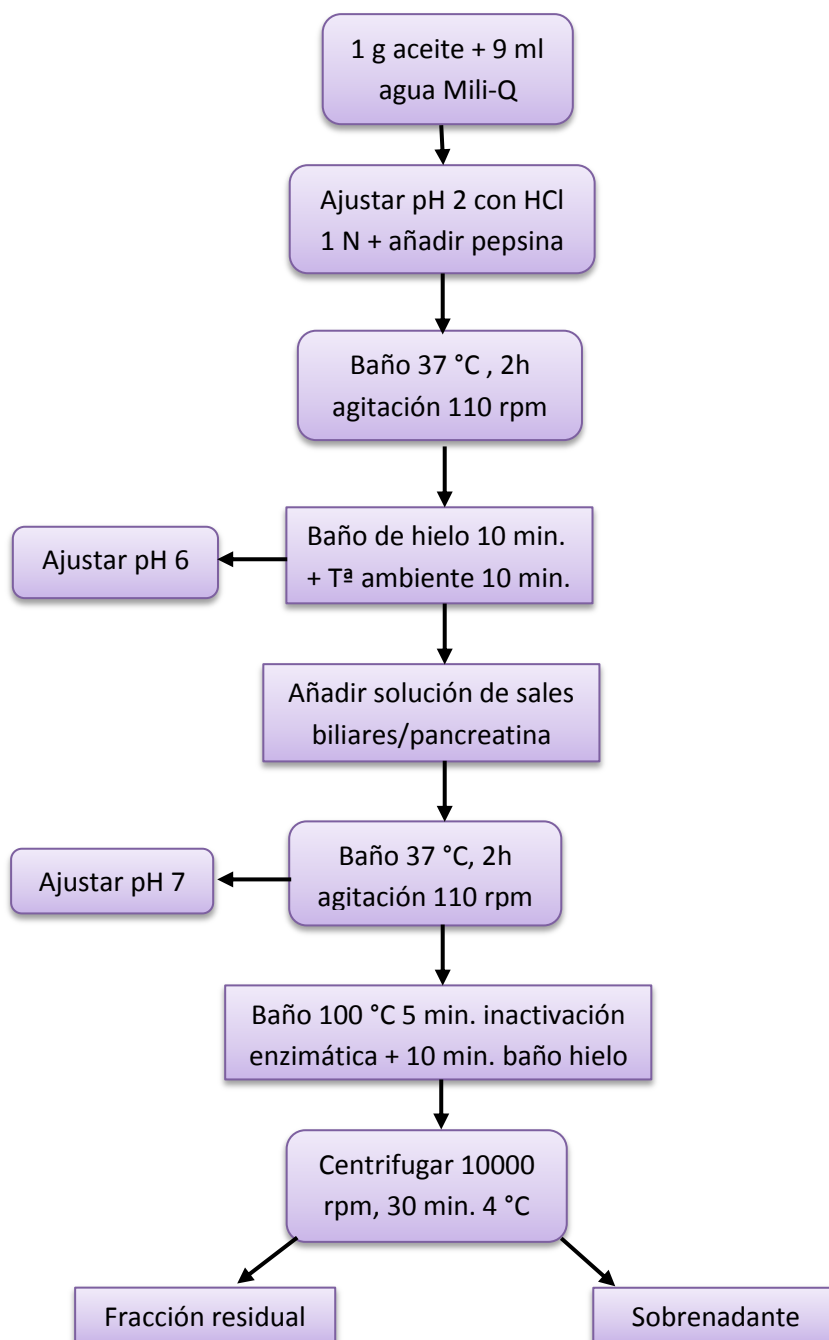


Figura 19. Esquema del proceso de digestión “in vitro”.

La fracción bioaccesible obtenida tras la digestión *in vitro* de los aceites fue utilizada para la determinación de los polifenoles individuales por UPLC y para los ensayos en cultivos celulares, que se describen a continuación. Además, en dicha

fracción y en la fracción residual se llevaron a cabo las determinaciones de polifenoles totales y actividad antioxidante.

Para la obtención de la fracción bioaccesible para los ensayos por UPLC se utilizaron 4 gramos de muestra y se ajustó el resto de los reactivos utilizados en el protocolo.

Los digeridos destinados al análisis de polifenoles fueron filtrados y liofilizados (LyoQuest Telstar, Madrid, España) (**Figura 20**). Las muestras liofilizadas se disuelven en 2 ml de metanol/acetonitrilo 50% (v/v).



Figura 20. Liofilización de las muestras y filtro utilizado con los digeridos.

6. Determinación de la actividad antioxidante

Estos ensayos se realizan en los extractos químicos obtenidos de los aceites y de las fracciones bioaccesible y residual tras la digestión *in vitro*, así como en la fracción absorbida tras la incubación con las células Caco-2.

Para todos los ensayos se preparó una curva patrón a partir de una solución madre de 0.1 mg/ml del reactivo de Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico).

Los resultados obtenidos en todos los ensayos se expresaron como nanomoles (o micromoles) de equivalentes de Trolox por kilo de muestra.

6.1 Método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

La capacidad antioxidante es estimada en términos de la actividad para capturar radicales en un medio acuoso, según el método descrito por Jiménez-Escrig *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

▪ Descripción de la técnica

El monocación radical ABTS $^{\bullet+}$, es un compuesto cromóforo verde- azulado muy estable, soluble en agua y con un máximo de absorción a 734 nm. Se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. Tanto la concentración de antioxidante como la duración de la reacción en la inhibición de la absorción radical catión, se tienen en cuenta al determinar la actividad antioxidante (Re *et al.* 1999). La reducción del color verde será proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra objeto de estudio (**Figuras 21 y 22**).

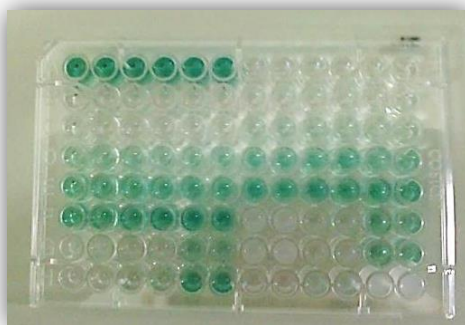


Figura 21. Placa multipocillo para la lectura del ensayo ABTS

▪ Reactivos

- Sal amónica del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).
- Persulfato potásico 2.45 mM.
- Buffer fosfato salino 5 mM, pH 7.4.

▪ Instrumental

- Balanza analítica Mettler AE 200, (Zurich).
- Cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor Hellma® (Barcelona, España).
- Espectrofotómetro Victor™ X3 multilabel plate reader (Waltham, USA).

▪ Preparación de reactivos

- Solución de ABTS 7 mM. Se prepara diluyendo 38.4 mg en 10 ml de persulfato potásico 2.45 mM 12-16 h antes de su uso, manteniéndolo en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se diluye con buffer fosfato salino hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 730 nm. Dicha dilución es estable durante dos días.

▪ Curva de calibrado

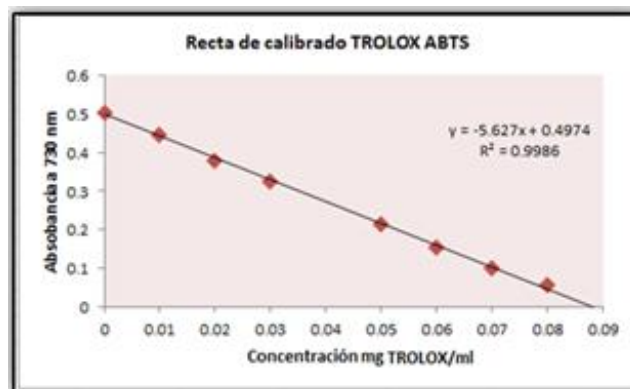


Figura 22. Recta de calibrado obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.

▪ Procedimiento

La determinación en las placas multipocillo se realiza añadiendo 20 μ l de la muestra y 280 μ l de la solución de ABTS. Se deja incubar 20 minutos en oscuridad y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 730 nm.

6.2 Método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

La actividad antirradical de diferentes muestras en medio metanólico es estimada mediante el procedimiento descrito por Morales y Jiménez-Pérez (2001) con ligeras modificaciones.

▪ Descripción de la técnica

El radical DPPH, de color morado, se reduce en presencia de antioxidantes manifestándose un cambio de color en la solución.

La deslocalización del electrón desapareado del radical DPPH, le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción en solución etanólica centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical, se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por lo tanto, pérdida de la absorbancia (Molyneux, 2004) (Figuras 23 y 24).

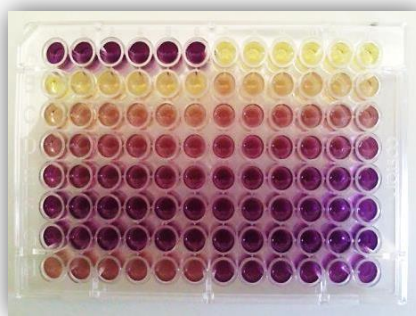


Figura 23. Placa multipocillo para la lectura del ensayo DPPH

▪ Reactivos

- 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

▪ Instrumental

- Balanza analítica Mettler AE 200, (Zurich).
- Espectrofotómetro Victor™ X3 multilabel plate reader (Waltham, USA).

▪ Preparación de reactivos

- Solución de DPPH: 1.85 mg en 25 ml de metanol (74 mg/l), preparada diariamente. Debe tener una absorción final de 1.8 AU a 520 nm.

▪ Curva de calibrado

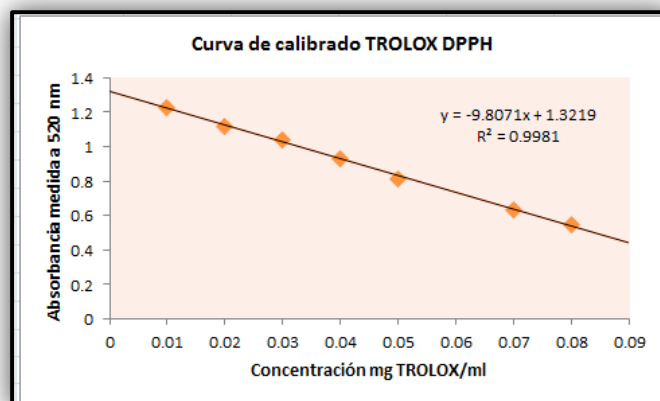


Figura 24. Curva de calibrado obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.

▪ Procedimiento

La determinación se lleva a cabo en las placas multipocillo de 96, y se realiza añadiendo 50 μ l de la alícuota de la muestra y 250 μ l de DPPH. Se incuba durante 1 h en oscuridad y se mide la absorbancia a 520 nm y a una temperatura de 30 $^{\circ}$ C.

6.3 Ensayo FRAP (ferric reducing antioxidant power)

La capacidad de cada muestra para reducir los componentes férricos es estimado según el protocolo descrito por Rufián- Henares *et al.* (2009).

▪ Descripción de la técnica

En este método se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo

ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del Fe^{2+} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia (Medina, 2010) (**Figuras 25 y 26**).

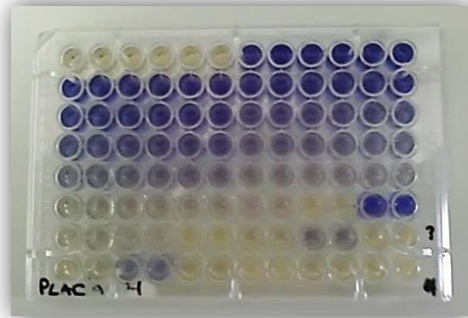


Figura 25. Placa multipocillo para la lectura del ensayo FRAP

▪ Reactivos

- HCl 40 mM.
- 2, 4, 6-tri (2-piridil)-s-triacina (TPTZ).
- Cloruro férrico 20 nM en agua Milli-Q.
- Tampón acetato sódico 0.3 M, a pH 3.6.

▪ Instrumental

- Espectrofotómetro Victor™ X3 multilabel plate reader (Waltham, USA).
- Cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor Hellma® (Barcelona, España).
- Baño de agua termostatzado Precistern JP Selecta (Barcelona, España).
- Balanza analítica Mettler AE-200 (Zurich).

▪ Preparación de reactivos

- Solución de FRAP: se prepara diariamente y atemperado a 37 °C. Para ello se toman 2.5 ml de una solución 10 mM de TPTZ junto a 2.5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mM y 25 ml de 0.3 M de buffer acetato a pH 3.6.

- TPTZ: 10 mM en HCL 40 mM.

▪ Curva de calibrado

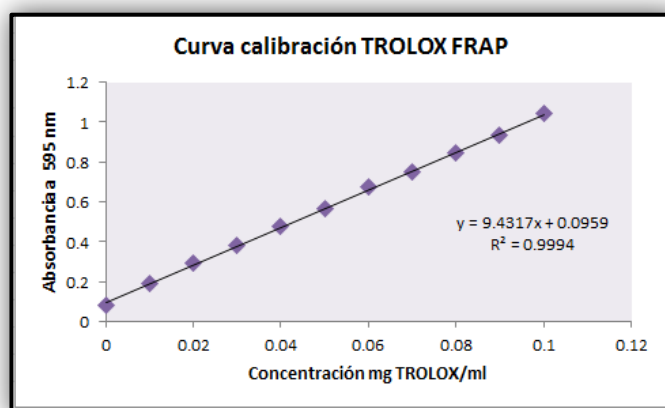


Figura 26. Curva de calibrado obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.

▪ Procedimiento

Para la determinación en las placas multipocillo se toman 280 μ l del reactivo FRAP y se adicionan 20 μ l de la muestra (el reactivo FRAP debe estar atemperado a 37 °C). Las placas se incuban durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad y se lee la absorbancia a 595 nm.

7. Cultivos celulares

Las células fueron proporcionadas por la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en el pase número 45, utilizándose en estos ensayos entre los pases 49-53. El medio de cultivo para el mantenimiento de las células, así como los reactivos adicionados para su reconstitución y para los ensayos, fueron específicos para cultivos celulares, suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), mientras que los recipientes para el cultivo fueron de la marca comercial Corning Costar (Cambridge, M.A., USA). Inicialmente, las células fueron sembradas en frascos de poliestireno tratados para cultivos celulares (falcon) de 75cm² (**Figura 27**) de superficie,

conteniendo medio esencial mínimo de Dulbecco, enriquecido en glucosa (DMEM, Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium).



Figura 27. Falcon utilizado para el cultivo de las células Caco-2.

El medio de cultivo está compuesto por:

- DMEM en polvo (Sigma D-5648)
- CO_3HNa (S-5761).....35mM
- Suero bovino fetal inactivado (F-7524).....15%
- Aminoácidos no esenciales (M-7145).....1%
- Mezcla antibiótico/antimicótico (A-9909).....1%
- Insulina bovina (I-6634).....0.1U.I./ml
- HEPES (H-2387).....15 mmol/l

Las células se mantuvieron a 37 °C en un incubador (modelo 5510E, NuAire, Plymouth, MN), en atmósfera 95:5 aire/ CO_2 , con una humedad del 90%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días, procediéndose a la tripsinización y siembra de las células en frascos nuevos cuando se alcanzaba una confluencia aproximada del 70%.

Para la tripsinización, las células se lavaron con HBSS (Hank's balanced salt solution) (Sigma H-2387), seguido del tratamiento con tripsina (0.25 %) durante 5

minutos a 37 °C. Después de que la monocapa celular fuera ligeramente despegada de la superficie del frasco, se adicionó medio de cultivo completo para detener la tripsinización, se homogeneizó la suspensión suavemente con pipeta Pasteur y se traspasó a tubos de centrifuga de 50 ml (**Figura 28**).



Figura 28. Incubador y cabina de flujo laminar.

Las células se centrifugaron a 900 rpm, a 20 °C, durante 5 minutos, y una vez obtenido el pellet o botón celular (**Figura 29**), se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en DMEM, distribuyéndose en los nuevos frascos para continuar el crecimiento celular.



Figura 29. Pellet de células formado tras centrifugación.

Todas la manipulaciones de los cultivos celulares se llevaron a cabo en condiciones de asepsia y bajo campana de flujo laminar (Modelo AV-100 Telstar, España) con el fin de mantener las condiciones estériles.

La **figura 30** muestra el aspecto de los cultivos y su adecuado desarrollo.

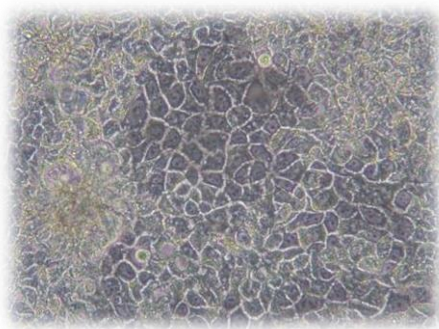


Figura 30. Monocapa de células Caco-2 en confluencia con estructura típica de mosaico (microscopía óptica).

Los cultivos celulares se utilizaron, por una parte, para evaluar los marcadores de estrés oxidativo a nivel celular y por otra, para realizar los ensayos de absorción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante a través de la monocapa de células. Como marcadores de estrés oxidativo se estudiaron las modificaciones en la viabilidad celular y la generación de ROS.

Para utilizar los sobrenadantes obtenidos con los cultivos celulares, fue necesario ajustar su osmolalidad a 0.300 osmol/kg (OSMOMAT 030-D Gonotec) con objeto de no alterar la viabilidad celular

7.1 Ensayos de viabilidad celular

▪ Descripción de la técnica

La viabilidad celular es una determinación de las células vivas o muertas, en base a una muestra total de células. Se evaluó utilizando dos métodos diferentes que se describen a continuación.

▪ Reactivos

- Azul tripán T-8154.
- Solución de tinción de rojo neutro.
- Solución de fijación (formaldehído 0.5%, CaCl₂ 0.1%).
- Tampón fosfato 0.1M (PBS), pH 7.4.
- Solución de solubilización (ácido acético glacial al 1% en una mezcla agua: etanol al 50%).

▪ Instrumental

- Cámara de Neubauer.
- Centrífuga LMC-3000 Grant instruments (Cambridgeshire, UK).
- Cabina de flujo laminar AV- 100 Telstar (Madrid, España).
- Microscopio invertido serie AE 2000 All science (Miami, USA).
- Lector de placas BioRad Model 550 Galileo (Madrid, España).

▪ 7.1.2 Método de tinción con azul tripán

Las células obtenidas tras la tripsinización, se siembran en placas Petri de 22 cm² de superficie a una densidad de 880000 cel/placa, a las que se les cambia el medio de cultivo cada 2-3 días. Se incuban a 37 °C, 5% CO₂ y 90% de humedad durante unos 6 días y una vez alcanzada la confluencia, se le añaden 3 ml del tratamiento a ensayar. Se incuban durante 2 horas y se tripsiniza.

Tras la tripsinización y una vez obtenido el “pellet” de células, se procede a la medida de la viabilidad mediante el test de tinción con azul tripán, en el que las células no viables aparecen teñidas con el colorante, debido a la destrucción de sus membranas celulares. Para ello, 200 µl de la suspensión de células, previamente homogeneizada, se mezclan con 200 µl de colorante azul tripán. Aproximadamente 20 µl de la mezcla se transfieren con una micropipeta a la cámara de Neubauer (**Figura 31**) y se realizó el conteo de células viables y no viables en un microscopio invertido (**Figura 32**).



Figura 31. Cámara de Neubauer utilizada para el conteo de células.



Figura 32. Microscopio invertido.

Los resultados se expresan como % de células viables:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{Células vivas} / \text{células totales}) \times 100$$

Siendo:

- Células totales: células vivas + células muertas

▪ 7.1.3 Método de tinción con rojo neutro

Las células obtenidas tras la tripsinización, se siembran en placas multipocillo de 96 pocillos de la marca comercial Corning Costar (Cambridge, M.A., USA) a una densidad de 75000 células/pocillo en 100 μ l de medio de cultivo.

Con el objetivo de permitir la adhesión de las células a la superficie de los pocillos, se incuban durante 48 horas a 37 °C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Transcurrido este tiempo, se retira el medio gastado, aspirando con una pipeta Pasteur, y se efectúa la medida de la viabilidad mediante el test de tinción con rojo neutro, colorante que tiñe las células viables al incorporarse dentro de sus lisosomas. El procedimiento utilizado es el descrito a continuación:

Una vez retiradas las soluciones de ensayo se añaden, a cada pocillo, 200 µl de la solución de tinción de rojo neutro, previamente calentada a 37 °C. Esta solución se prepara a partir de una inicial al 0.4% (w/v) en agua Milli-Q que se diluye 80 veces con medio de cultivo. Las células se incuban durante 2 horas con el colorante, que luego se desecha aspirándolo con pipeta Pasteur. A continuación se lleva a cabo la fijación de las células, sumergiendo cada placa en una bandeja que contiene 1 litro de una solución de fijación durante 30 segundos, seguido de una fase de lavado consistente en la inmersión de las placas en tampón fosfato PBS al menos dos veces, desechando el medio cada vez.

Tras secar las placas, se procede al lisado de las células, añadiendo a cada pocillo 200 µl de una solución de solubilización, se envuelven con papel film transparente para evitar la evaporación del alcohol y se incuban a 4 °C durante una noche.

Al día siguiente se realiza la lectura de la absorbancia del contenido de cada pocillo a 540 nm en un lector de placas, previa homogenización en una placa osciladora (**Figura 33**).

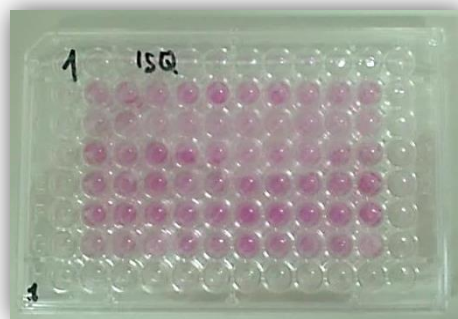


Figura 33. Placa multipocillo para el ensayo de tinción de rojo neutro.

El porcentaje de viabilidad se expresó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs muestra} \times 100) / \text{Abs control}$$

Se utilizan como control aquellos pocillos en los que las células fueron incubadas con medio de cultivo.

7.2 Ensayo de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se producen en las células vivas a causa del metabolismo celular. Dichas especies pueden dañar directamente al ADN y los lípidos de membrana, así como a otras macromoléculas causando un daño oxidativo a la célula (Uttara *et al.* 2009).

La generación de ROS se ha determinado como un marcador de estrés oxidativo a nivel celular. Se ha utilizado para estudiar el efecto basal de las muestras objeto del estudio (fracción bioaccessible obtenida tras la digestión *in vitro*), así como el efecto protector de las muestras ante un daño oxidativo inducido.

▪ Descripción de la técnica

En presencia de ROS, la diclorofluorescina (DCFH) es oxidada a fluoresceína (DCF) altamente fluorescente pudiéndose utilizar la fluorescencia intracelular como un índice para cuantificar el total de estrés oxidativo en las células (Wang *et al.* 1999).

▪ Reactivos

- Diclorofluorescina.
- Ter-butil-hidroperoxido.

▪ Instrumental

- Espectrofotómetro Victor™ X3 multilabel plate reader (Waltham, Massachusetts, USA).

▪ Procedimiento

Las células se siembran en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^5 , utilizando 1 ml por pocillo y se incuban a 37 °C durante 48 horas. Previo lavado con HBSS se añaden 1.5 ml de los diferentes tratamientos a ensayar y se incuban las placas durante 2 horas. Para nuestro ensayo utilizamos una dilución 1:2 en DMEM sin suero bovino fetal de los digeridos obtenidos, mínima dilución que no afectó significativamente la viabilidad celular (siempre >85%).

Una vez transcurridas las 2 horas, se añade previamente atemperada a 37 °C, 0.5 ml de DCFH 20 μ M a cada pocillo y se incuba durante 60 minutos. Se mide inmediatamente en el lector de placas a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de 535 nm de emisión, con temperatura constante de 37 °C para medida basal, o bien adicionamos un volumen de 0.5 ml por pocillo de ter-butil-hidroperóxido y después medimos de la misma forma para determinar el efecto protector. Realizamos las medidas a tiempo 0, 20, 50, 70 y 90 minutos (**Figura 34**).

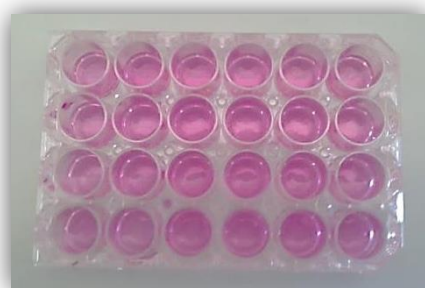


Figura 34. Placa multipocillos para la determinación de ROS.

▪ **Expresión de los resultados**

Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia

7.3 Ensayos de absorción

▪ **Descripción de la técnica**

Este tipo de ensayo nos permite determinar la cantidad de los compuestos que son absorbidos a través de la monocapa de células

▪ Reactivos

- Buffer de transporte: 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 5 mM glucosa y 50 mM HEPES pH 7.

▪ Instrumental

- Centrífuga LMC-3000 Grant instruments (Cambridgeshire, UK).
- Cabina de flujo laminar AV- 100 Telstar (Madrid, España).
- Microscopio invertido serie AE 2000 All science (Miami, USA).
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS (Waltham, USA)
- Medidor de pH Basic 20 Crison (Barcelona, España).
- Placas bicamerales Transwell, (24 mm de diámetro, 4.7 cm² de superficie, 3 mm de tamaño de poro, núm. Ref. 1414, Costar) (Madrid, España).⁷

▪ Procedimiento

Las células se siembran en placas bicamerales a una densidad de 100000 células/cm², con 2.5 ml de medio de cultivo en el compartimento basolateral y 1.5 ml en el compartimento apical (**Figura 35**). El medio se cambia cada 2 días y los experimentos se realizan tras 21 días desde la siembra. Durante todo este período, cada 2-3 días se comprueba la formación de estrechas uniones celulares durante la diferenciación y, por tanto, la integridad y confluencia de la monocapa.

▪ 7.3.1 Integridad de la monocapa: transporte del rojo fenol

Para su determinación se aspira el medio de las placas bicamerales lavando ambas cámaras con buffer de transporte, exento de rojo fenol. Una vez eliminado cualquier posible resto de colorante, se añaden 2.5 ml de buffer en la cámara basolateral y 1.5 ml de medio de cultivo, que contiene rojo fenol, en la apical, manteniendo las células en el incubador a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se recoge el contenido de la cámara basolateral, se ajusta el pH a 10 (donde sólo existe la forma básica del rojo fenol) con NaOH 5N y se mide su absorbancia a 558 nm, calculándose el porcentaje de difusión del colorante. Las medidas de las monocapas con porcentajes

de transporte superiores al 5% se rechazaban para la realización de los ensayos. Los valores medios alcanzados se aproximaron al 2% de transporte.

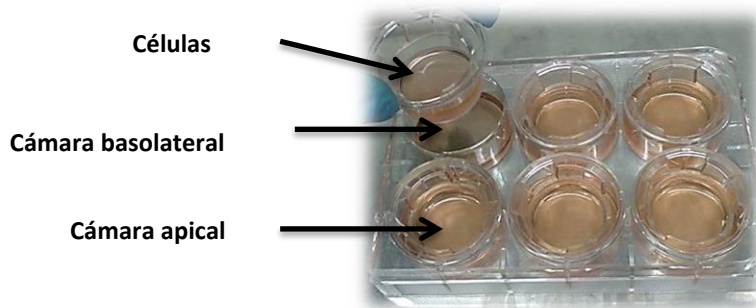


Figura 35. Placas Transwell.

▪ 7.3.2 Desarrollo del ensayo

Antes de comenzar el ensayo, todas las soluciones se atemperan a 37 °C. Se retira el medio gastado tanto de la cámara apical como de la basolateral, lavándose la monocapa de células dos veces consecutivas con HBSS. En todas las cámaras basolaterales se adicionan 2.5 ml de solución de buffer de captación, mientras que en las cámaras apicales se adicionan 1.5 ml de las diluciones de los digeridos de los aceites ajustados, incubándose durante 2 horas a 37 °C. Tras este período, se recoge el contenido de la cámara basolateral, y se almacena rápidamente en tubos protegiéndolos de la luz y a una temperatura de -80 °C hasta su posterior utilización para el análisis tanto de polifenoles totales, como actividad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) (Figura 36).

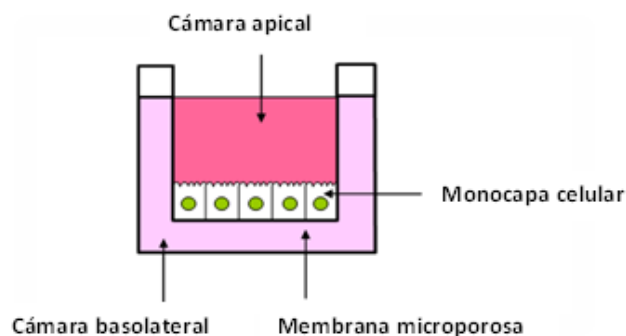


Figura 36. Esquema del ensayo de transporte.

▪ Expresión de los resultados

Con esto se calcula el transporte de compuestos antioxidantes a través de la monocapa celular. Por diferencia entre las cantidades iniciales adicionadas en la cámara apical y lo detectado en la basolateral, se determinan las cantidades transportadas a través de la monocapa y la eficacia del transporte: porcentaje del compuesto transportado respecto de la cantidad añadida.

8. Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos en el presente trabajo para las diferentes variables analizadas, se procede al análisis estadístico empleando los softwares Statgraphics 6.0, SPSS 15.0 y SAS (2012).

En primer lugar se comprueban si los datos se ajustaban a una distribución normal mediante la aplicación del test de Komogorov-Smirnov, así como la homogeneidad de las varianzas de las muestras mediante el test de Barlett.

Para determinar las posibles diferencias entre los aceites estudiados, los datos se someten a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, cuyo modelo es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde μ es la media global, α_i es el efecto fijo (en nuestro caso, tipo de aceite) y ε_{ij} representa al error muestral.

Las diferencias entre las medias con las variables analizadas se establecen realizando comparaciones múltiples mediante la prueba de HSD de Tukey y la prueba de Duncan. Cuando se incumplen los supuestos del modelo de análisis de varianza, se aplica la prueba de Kruskal-Wallis.

Se estudian las relaciones existentes entre diferentes variables (polifenoles, tocoferoles, actividad antioxidante, etc.) mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson.

Para estudiar las similitudes y diferencias entre los diversos aceites, así como la importancia de las diferentes variables analizadas dentro de los modelos predictores,

se realizan diversos métodos multivariados, como Análisis Discriminante (para establecer las diferencias entre los aceites por medio de las variables que los definen) y Análisis Factorial Multivariante (que nos sirve para seleccionar aquellas variables que poseen un comportamiento homogéneo y que caracterizan a los diversos aceites objeto de estudio).

El estudio estadístico de los datos obtenidos en el presente trabajo, se establece a partir de valores de las concentraciones de los diferentes parámetros analizados y de los factores considerados como variables de respuesta experimental determinados en las muestras, a fin de determinar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas de dichos factores sobre las variables.

El paquete estadístico empleado a tal efecto ha sido el Statgraphics 6.0, , SPSS 15.0 y el SAS (2012) del que se utiliza el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) unifactorial, y se emplea el test de la t de Student para los métodos paramétricos con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$), el test de Kruskal-Wallis para los no paramétricos, con un nivel de significancia también del 95% ($p < 0.05$) y la prueba de Tuckey para comparar variaciones significativas entre las medias ($p < 0.05$).

Para el análisis de los ácidos grasos se lleva a cabo un análisis discriminante multivariado como una herramienta utilizada en la caracterización de los aceites (ver trabajo).

Se realiza un análisis factorial multivariante utilizando para ello el perfil fenólico, contenido en tocoferol y la actividad antioxidante.

La prueba de rango múltiple de Duncan para la comparación de medias que muestran una variación significativa ($P < 0.05$) se utiliza para los resultados obtenidos de los ensayos en cultivos celulares.

9. Bibliografía

Abad-García B, Berrueta LA, Garmón-Lobato S, Gallo B, Vicente F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography

- with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009, 1216:5398-415.
- Borras- Linares, MI. Uso de técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas de alta resolución para estudios metabolómicos de nutraceúticos y matrices vegetales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2013
- Cabrera-Vique C, Bouzas PR, Oliveras-López MJ. Determination of trace elements in extra virgin olive oils: A pilot study on the geographical characterization. *Food Chem* 2012. 134:434–9.
- Cert A, Moreda W, Perez-Camino MC. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. Review. *J Chromatogr A* 2000, 881:131–48.
- Consejo Oleícola Internacional Preparación y obtención de esteres metílicos de ácidos grasos. (COI/T.20/Doc. nº 24). COI, 2001.
- Ebrahimi M, Rajion MA, Goh YM, Sazili AQ, Schonewille JT. Effect of linseed oil dietary supplementation on fatty acid composition and gene expression in adipose tissue of growing goats. *BioMed Res Int* 2013, 2013:1-11.
- Escarpa A, Morales MD, Gonzalez MC. Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by high-performance liquid chromatography-diode-array-detection. *Anal Chim Acta* 2002, 460: 61-72.
- Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. Human tumor cells in vitro. J. Fogh, editor. Plenum Publishing Corp., New York 1975, pp 115-41.
- Goh E, Gledhill A. Analysis of polyphenols in fruit juices using ACQUITY UPLC H-Class with UV and MS Detection. Waters, Manchester 2011.
- Gonthier MP, Rios LY, Verny M, Révész C, Scalbert A. Novel liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification in human urine of microbial aromatic acid metabolites derived from dietary polyphenols. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 789:247-55.
- Hernández JM. Espectrometría de masas. Aplicaciones clínicas. Ed Cont Lab Clín 2007, 11:19-30
- Hoffmann E, Stroobant V. Mass spectroscopy, principles and aplicaciones. 2nd Ed. Wiley, New York 2001.

- Jiménez-Escrig A, Dragsted LO, Daneshvar B, Pulido R, Saura-Calixto F. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51:5540-5545.
- Laparra JM, Glahn RP, Miller DD. Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and iron (Fe) availability to Caco-2 Cells. *J Agric Food Chem* 2008, 56:10999–05.
- Marfil R. Parámetros de calidad y componentes de interés nutricional del aceite de argán (*Argani spinosa*). Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2008.
- McNair HM, Esquivel B. Cromatografía líquida de alta presión. Ed. OEA, Washington 1973.
- Medina LA. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. Revista electrónica autodidacta, ISSN: 1989-9041, 2010.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol* 2004, 26:211-9.
- Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. 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. *J Agric Food Chem* 2001, 72:119-25.
- Mullen W, Borges G, Lean ME, Roberts SA, Crozier A. Identification of metabolites in human plasma and urine after consumption of a polyphenol-rich juice drink. *J Agric Food Chem* 2010, 24:2586-95.
- Museo Nacional de Ciencias Naturales. Cromatografía de gases. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf
- Museo Nacional de Ciencias Naturales. Cromatografía líquida de alta eficacia. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf.
- Museo Nacional de Ciencias Naturales. Espectrometría de Masas. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf
- Norma UNE-EN ISO 9936:2007. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del contenido de tocoferol y tocotrienol mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Modificación 1: Actualización de los reactivos y la confirmación de la validez de los datos estadísticos.

O'Fallon JV, Busboom JR, Nelson ML, Gaskins CT. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J Anim Sci* 2007, 85:1511-21.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999, 26:1231-7.

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, y sus posteriores modificaciones (Reglamento 796/2002, 1989/2003, 640/2008 y 61/2011)

Saura-Calixto F, Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish mediterranean diet. *Food Chem* 2006, 94: 442-7

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos, RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 1999, 299:152-78.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de Análisis Instrumental. Hieman, 5^a edición, Mc Graw Hill. Madrid, 2001.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009, 7: 65–74.

Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27:612–6.

Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, Plumb RS. High resolution “ultra performance” liquid chromatography coupled to Oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *JProteome Res* 2005, 4:591-8.



V. RESULTADOS Y

DISCUSIÓN



1. Parámetros de calidad de los aceites de estudio

Los resultados obtenidos se escuadran dentro de los márgenes establecidos en la legislación para de una de las categorías de los aceites.

TABLA 11. Determinación de parámetros de calidad en aceite de argán virgen extra

Muestras aceite de argán	Índice de acidez (%)	Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg)	K ₂₇₀	K ₂₃₂
1	0.64 ±0.11	14.6±2.28	0.27±0.10	0.67±0.00
2	0.38±0.09	6.43±1.15	0.14±0.04	0.95±0.28
3	0.26±0.00	ND ^a	0.04±0.01	1.12±0.00
4	0.76±0.01	11.6±0.25	0.34±0.01	1.35±0.01
5	0.72±0.02	11.6±0.02	1.45±0.01	1.48±0.01
6	0.60±0.01	7.52±0.02	0.20±0.01	1.00±0.01
7	0.30±0.00	5.93±0.01	0.39±0.01	0.95±0.01

^a ND: No detectado

TABLA 12. Determinación de parámetros de calidad en otros aceites vegetales comestibles

Muestras de aceites vegetales	Índice de acidez (%)	Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg)	K ₂₇₀	K ₂₃₂
Sésamo	0.58 ±0.02	11.6±0.00	0.22±0.02	0.77±0.03
Lino	0.90±0.00	8.74±0.88	0.23±0.02	1.93±0.00
Nuez	0.60±0.02	8.85±0.97	0.21±0.00	2.42±0.00
Almendra	0.27±0.02	14.7±0.97	0.06±0.01	2.12±0.01
Trigo	0.90±0.00	ND ^a	1.15±0.00	3.28±0.01
Soja virgen	0.28±0.01	ND ^a	0.36±0.00	3.28±0.01
Pepita de uva	0.03±0.01	8.62±0.73	2.26±0.01	2.23±0.00
Aguacate	0.03±0.00	15.5±0.04	0.28±0.04	2.56±0.01
Girasol	0.02±0.00	9.21±0.54	1.22±0.01	1.29±0.01
Calabaza	0.90±0.01	5.84±0.21	0.71±0.03	2.04±0.02
Oliva virgen extra	0.26±0.04	4.42±1.34	0.13±0.60	1.63±0.12

^a ND: No detectado

TABLA 13. Determinación de metales traza en aceite de argán virgen extra

Muestras de aceite de argán	Cobre, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Hierro, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Cromo, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Manganeso, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Plomo, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$
1	82.60±3.67	192.80±10.3	27.25±1.76	17.25±1.76	16.75±0.35
2	79.98±5.02	212.27±25.6	26.46±1.81	17.46±3.44	16.03±1.24
3	98.90±0.16	179.00±0.12	40.50±0.15	24.50±0.12	14.50±0.12
4	94.50±0.18	285.60±0.10	29.00±0.14	19.00±0.12	16.00±0.11
5	80.50±0.20	220.58±0.12	31.50±0.13	26.50±0.13	16.50±0.10
6	80.60±0.16	210.70±0.10	30.00±0.10	30.10±0.11	16.10±0.09
7	78.75±0.15	398.50±0.11	29.50±0.12	29.50±0.12	19.70±0.10

^a Expresado como la media de 3 determinaciones por muestras

TABLA 14. Determinación de metales traza en aceites vegetales comestibles

Muestras de aceites vegetales	Cobre, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Hierro, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Cromo, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Manganeso, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$	Plomo, $\mu\text{g}/\text{kg}^a$
Sésamo	47.80±0.10	170.30±0.15	26.80±0.14	36.80±0.16	16.00±0.11
Lino	45.00±0.09	175.60±0.11	28.20±0.12	38.20±0.12	18.50±0.12
Nuez	80.80±0.12	238.00±0.12	36.00±0.16	46.00±0.16	17.00±0.10
Almendra	40.80±0.12	160.80±0.11	40.40±0.16	20.40±0.10	17.50±0.13
Trigo	36.00±0.10	255.55±0.10	58.00±0.20	28.00±0.20	14.75±0.13
Soja	39.60±0.14	120.50±0.11	40.40±0.10	40.40±0.10	16.50±0.11
Uva	48.50±0.12	211.58±0.14	50.50±0.18	50.10±0.15	15.50±0.11
Aguacate	88.80±0.16	140.50±0.12	45.40±0.15	25.40±0.15	16.00±0.10
Girasol	78.40±0.14	120.00±0.08	50.50±0.20	50.50±0.20	25.00±0.15
Calabaza	55.50±0.15	215.20±0.09	35.50±0.20	45.50±0.10	24.50±0.12

^a Expresado como la media de 3 determinaciones por muestras

2. Estudio del perfil en ácidos grasos del aceite de argán virgen y otros aceites vegetales comestibles mediante cromatografía de gases y análisis discriminante.

Research Article

Characterization of Fatty Acid Profile of Argan Oil and Other Edible Vegetable Oils by Gas Chromatography and Discriminant Analysis

Ascensión Rueda,¹ Isabel Seiquer,² Manuel Olalla,¹ Rafael Giménez,¹
Luis Lara,² and Carmen Cabrera-Vique¹

¹ Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja, 18071 Granada, Spain

² Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del Jueves s/n, Armilla, 18100 Granada, Spain

Correspondence should be addressed to Isabel Seiquer; isabel.seiquer@eez.csic.es

Received 1 April 2014; Revised 4 July 2014; Accepted 24 July 2014; Published 18 August 2014

Academic Editor: M. Beatriz P. P. Oliveira

Copyright © 2014 Ascensión Rueda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Virgin argan oil is an emergent oil that is being introduced into specialized international markets as a healthy and luxury food. In order to compare the fatty acid composition of argan oil with that of the eleven other vegetable edible oils, a combination of gas chromatography as analytical technique and multivariate discriminant analysis was applied. This analysis takes into account the conjoint effect of all the variables analyzed in the discrimination between oils and also shows the contribution of each variable to oils characterization. The model correctly classified 100% oil samples. According to the fatty acid composition, argan oil showed closest similarity firstly with sesame oil and secondly with high oleic sunflower oil. Olive oil was close to avocado oil and almond oil, followed by argan oil. Thus, similarities and differences between vegetable oils based on their fatty acid profile were established by the application of multivariate discriminant analysis. This method was proven to be a useful tool to study the relationships between oils according to the fat composition and to determine the importance of the fatty acid variables on the oils classification.

1. Introduction

Virgin argan oil has been investigated due to its particular composition and potential health benefits [1, 2]. This oil is mainly produced in Southwest of Morocco from the nut of the argan tree (*Argania spinosa*, L.) and represents an important fat source in the Magreb area [3]. However, nowadays its consumption has been extended to other countries, that is, USA or Japan. In 2003, Morocco introduced a new regulation to define quality specifications for virgin argan oil and to classify argan oils into different categories [4], being extra virgin argan oil the highest quality category. The traditional extraction method (hand pressure) coexists with the semi-industrial method (mechanical cold pressure without water addition) applied in recently developed cooperatives and that allows obtaining high-quality oils [2]. Recent studies suggest

that argan oil may play a significant role in the prevention of cardiovascular diseases due to its antioxidant potential and its hypolipidemic, hypocholesterolemic, and antihypertensive effects [5, 6]. According to bibliographic data, argan oil is rich in oleic and linoleic acids, polyphenols and tocopherols [7–9], and other minor compounds such as sterols, carotenoids, xanthophylls, squalene, coenzyme Q₁₀, and melatonin [2, 3, 10].

The scientific evidence has largely demonstrated that the “quality” of fat, apart from the “quantity” of fat, has a strong impact on consumer health. Public health institutes of different countries over the world, as well as international organisms such as the FAO/OMS, have established recommended daily intakes for each type of fatty acids (FA), that is, saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), and polyunsaturated (PUFA), generally limiting the SFA

intake and promoting MUFA and PUFA consumption [11]. Nowadays, oils rich in unsaturated fatty acids are largely recommended as substitutes of saturated-fats used in industrialized countries [11]. Thus, FA composition occupies a prominent place in evaluating the nutritional quality of oils. This concern for the FA impact has led nutritionists and food manufacturers to look for fats and oils containing specific FA of supposed beneficial effects, while researchers have directed their efforts to compare different oils according to their FA composition [12]. In this line, the nutritional qualities of argan oil have been proposed to be identical to those of olive oil, given that both contain high levels of oleic acid, with linoleic acid as the second major PUFA and being the SFA of both oils palmitic and stearic acids [1]. Thus, FA percentage distribution allows suggesting similarities and distinctiveness among oils. However, the relationships between oils are affected by all the variables and not only by majority FA [13]. Therefore, only using multivariate methods to analyze the combination effects of all variables, holistic information of samples can be obtained.

The aim of this work was to (1) fully characterize the FA profile of argan oil and eleven other vegetable oils, (2) apply multivariate discriminant analysis to study the relationship between oils according to their FA composition, and (3) determine which of the fatty acids accounts the most for the differences on the discrimination of vegetable oils. With this purpose, FA profile of the different oils was performed using gas chromatography.

2. Materials and Methods

2.1. Samples. A total of 14 samples of virgin argan oils, produced in Morocco by the semi-industrial method and commercialized in the Spanish market, were analysed. The other vegetable oils were almond, wheat germ, high oleic sunflower, linseed, walnut, avocado, sesame, grape seed, soybean, pumpkin seed, and virgin olive oil. Four samples of each type of oil were analysed; all of them were purchased from local supermarkets and specialised groceries. Only sunflower and grape seed oils were refined, whereas the remainders were virgin oils. All samples were maintained at temperature of 4°C in an inert nitrogen atmosphere until analysis.

2.2. Apparatus and Chemicals. Main fatty acids were quantified by gas chromatography using a Perkin Elmer Autosystem gas chromatograph (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), equipped with a flame ionization detector (FID) and conventional injector. A capillary column Supelco SPTM 2380 (30 m × 0.25 mm i.d., 0.2 µm film thickness) was used. All chemicals were of analytical grade or higher purity unless otherwise stated. The fatty acid standard mix FAME mix 47885-U provided by Sigma (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) was used for FA identification, according to their retention times. Sodium methylate 0.2 N, sulphuric acid, and n-hexane were purchased from Panreac (Panreac, Barcelona, Spain) and used to extract fatty acid methyl esters.

2.3. Fatty Acid Analysis. Analyses were carried out in triplicate. For determining the FA composition of oils, adaptation of the official method of the International Olive Oil Council [14], which precision has been statistically assessed by Cert et al. [15], was used. Fatty acids were determined as fatty acid methyl esters (FAME) after treatment of 0.3 g of the oil sample with 5 mL of sodium methylate 0.2 N. FAME were prepared by acidic esterification in the presence of methanolic H₂SO₄ (4%, v/v); the organic phase was removed with n-hexane (5 mL). The injection volume was 2 µL, and the carrier gas was nitrogen (15 psi). The oven temperature was kept at 60°C for 3 min and was raised to 170°C at a rate of 5°C/min; after 9 min the temperature was raised at 250°C at a rate of 10°C/min. The injector and detector were maintained at 230°C and 250°C, respectively. Individual FAME were identified by comparing their retention times with those of pure standards. Quantification of individual fatty acids was carried out by calculating the corresponding relative percentage of the total FAME, according to the area normalization procedure. In addition, sums of total SFA, MUFA, PUFA, PUFA n-3 and n-6, and SFA/PUFA and n-6/n-3 ratios have been calculated.

2.4. Statistical Analysis. Results of individual FA content and sums of FA of the different oils were analyzed by one-way ANOVA followed by Tuckey test to compare significant variations between means ($P < 0.05$). Moreover, in order to verify the capacity of the FA analysis as a tool for oils characterization a multivariate discriminant analysis was performed. The basic purpose of discriminant analysis is to estimate the relationship between a single categorical dependent variable (the type of oil in this case) and a set of quantitative independent variables (the percentage contents of the fatty acids), since the relationships between oils are affected by all the variables and only analyzing the combination effects by multivariate methods similarities and differences between oils can be established effectively. This analysis can determine which of the independent variables accounts the most for the differences in the average score profiles of the different oils. Moreover, graph representation of this analysis allows assessing the similarity of the oils by their FA composition. All the statistical analyses were carried out using the StatGraphics Centurion XV software (StatPoint Technologies, Inc., USA, 2006).

3. Results and Discussion

3.1. Fatty Acid Profile in Virgin Argan Oil. The fatty acid composition and the related sums and ratios of the 14 samples of virgin argan oil analyzed are summarized in Tables 1 and 2, respectively. Figure 1 shows a chromatogram of a sample of argan oil. Values of the FA analyzed in all the argan oil samples were within the limits established by the Moroccan norm for virgin argan oils [4] as follows (weight % of methyl esters): myristic acid (C14:0) ≤ 0.2, palmitic acid (C16:0) 11.5–15.0, palmitoleic acid (C16:1) ≤ 0.2, margaric acid (C17:0) traces, stearic acid (C18:0) 4.3–7.2, oleic acid (C18:1 n-9) 43.0–49.1, linoleic acid (C18:2 n-6) 29.3–36.0, arachidic acid (C20:0) ≤ 0.5, gadoleic acid (C20:1 n-11) ≤ 0.5, and behenic acid (C22:0)

TABLE I: Fatty acid composition (%) of virgin argan oil* .

Sample number	Myristic C14:0	Palmitic C16:0	Palmitoleic C16:1	Margaric C17:0	Stearic C18:0	Oleic C18:1 n-9	Linoleic C18:2 n-6	Arachidic C20:0	Linolenic C18:3 n-3	Gadoleic C20:1 n-9	Behenic C22:0	Lignoceric C24:0
1	0.12 ± 0.01	12.5 ± 0.14	0.06 ± 0.04	0.02 ± 0.01	6.95 ± 0.14	46.2 ± 0.32	33.0 ± 0.27	0.40 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02
2	0.12 ± 0.02	12.8 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.04	4.81 ± 0.43	48.1 ± 0.44	32.9 ± 0.13	0.44 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.15 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.06 ± 0.00
3	0.12 ± 0.02	12.8 ± 0.52	0.09 ± 0.00	0.01 ± 0.00	6.96 ± 0.68	42.5 ± 2.67	36.8 ± 1.43	0.42 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00
4	0.12 ± 0.01	12.2 ± 0.21	0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.00	5.54 ± 1.11	45.8 ± 2.21	35.3 ± 1.01	0.41 ± 0.03	0.22 ± 0.18	0.14 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
5	0.12 ± 0.00	12.4 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.00	5.36 ± 1.16	43.4 ± 0.52	36.0 ± 0.29	0.39 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.01
6	0.13 ± 0.02	12.1 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.01	7.00 ± 0.21	46.5 ± 1.94	34.0 ± 3.56	0.42 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
7	0.13 ± 0.02	12.9 ± 0.90	0.10 ± 0.04	0.01 ± 0.01	6.13 ± 1.51	46.9 ± 4.51	32.5 ± 5.05	0.44 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00
8	0.13 ± 0.02	12.8 ± 0.73	0.06 ± 0.00	0.02 ± 0.01	6.31 ± 0.49	46.4 ± 2.97	33.7 ± 3.85	0.41 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01
9	0.11 ± 0.00	12.4 ± 0.81	0.07 ± 0.00	0.03 ± 0.00	5.84 ± 0.05	46.1 ± 1.33	34.0 ± 3.31	0.43 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.01
10	0.11 ± 0.01	12.0 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	6.10 ± 1.06	47.5 ± 0.61	34.7 ± 0.09	0.45 ± 0.02	0.38 ± 0.00	0.14 ± 0.03	ND	0.03 ± 0.01
11	0.10 ± 0.02	11.6 ± 0.28	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.01	4.48 ± 0.54	43.7 ± 0.71	36.1 ± 0.31	0.61 ± 0.28	0.50 ± 0.03	0.17 ± 0.01	ND	0.05 ± 0.02
12	0.14 ± 0.01	12.8 ± 0.44	0.10 ± 0.01	0.01 ± 0.01	7.07 ± 0.11	45.3 ± 0.66	34.4 ± 0.20	0.41 ± 0.02	0.37 ± 0.00	0.16 ± 0.01	ND	0.07 ± 0.02
13	0.10 ± 0.03	14.4 ± 2.25	0.10 ± 0.01	0.03 ± 0.04	4.11 ± 2.41	44.9 ± 4.39	35.4 ± 4.70	0.16 ± 0.08	0.13 ± 0.13	0.16 ± 0.06	0.12 ± 0.01	0.28 ± 0.01
14	0.15 ± 0.01	13.7 ± 1.40	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.01	4.39 ± 2.46	44.7 ± 4.87	35.7 ± 0.52	0.21 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.40 ± 0.02	0.31 ± 0.31	0.16 ± 0.04
Mean	0.12	12.7	0.08	0.02	5.83	45.6	34.6	0.40	0.34	0.17	0.05	0.07
SD	0.01	0.71	0.02	0.01	1.02	1.60	1.32	0.10	0.11	0.07	0.08	0.07

* Values are expressed as means ± standard deviation (SD). ND = not detected.

TABLE 2: Sum of fatty acids in virgin argan oil*.

Sample number	ΣSFA	ΣMUFA	ΣPUFA	ΣPUFA n-3	ΣPUFA n-6	SFA/PUFA	n-6/n-3 ratio
1	20.1 ± 0.02	46.5 ± 0.25	33.5 ± 0.40	0.44 ± 0.03	33.0 ± 0.06	0.60	75.0
2	18.2 ± 0.52	48.4 ± 0.44	33.3 ± 0.08	0.40 ± 0.05	32.9 ± 0.13	0.55	82.2
3	20.1 ± 1.19	42.7 ± 2.64	37.1 ± 1.45	0.35 ± 0.03	36.8 ± 1.42	0.54	105
4	18.3 ± 1.35	46.1 ± 2.18	35.6 ± 0.83	0.22 ± 0.18	35.4 ± 1.01	0.51	160
5	20.0 ± 0.25	43.6 ± 0.55	36.4 ± 0.30	0.35 ± 0.01	36.0 ± 0.29	0.55	102
6	18.8 ± 1.58	46.7 ± 1.94	34.4 ± 3.52	0.38 ± 0.03	34.0 ± 3.55	0.55	89.4
7	19.2 ± 0.45	47.2 ± 4.57	32.9 ± 5.02	0.37 ± 0.03	32.5 ± 5.04	0.58	87.8
8	19.3 ± 0.83	46.6 ± 2.98	34.1 ± 3.81	0.37 ± 0.03	33.7 ± 3.84	0.56	90.3
9	19.2 ± 1.94	46.4 ± 1.34	34.4 ± 3.28	0.39 ± 0.03	34.0 ± 3.30	0.56	87.2
10	17.1 ± 0.54	47.7 ± 0.62	35.1 ± 0.09	0.38 ± 0.01	34.8 ± 0.08	0.49	91.6
11	19.5 ± 0.45	43.9 ± 0.72	36.6 ± 0.27	0.50 ± 0.03	36.1 ± 0.31	0.53	72.2
12	19.6 ± 0.85	45.6 ± 0.65	34.8 ± 0.18	0.37 ± 0.00	34.4 ± 0.19	0.56	92.8
13	19.2 ± 0.24	45.2 ± 0.60	35.5 ± 4.56	0.13 ± 0.13	35.4 ± 4.69	0.55	272
14	18.9 ± 1.35	42.2 ± 0.88	35.9 ± 0.46	0.15 ± 0.05	35.7 ± 0.51	0.53	238
Mean	19.2	45.8	34.9	0.34	34.6	0.55	117
SD	0.84	1.60	1.29	0.11	1.32	0.03	63.0

* Values are expressed as means ± standard deviation (SD). ΣSFA = sum of myristic, palmitic, margaric, stearic, arachidic, behenic, and lignoceric acids; ΣMUFA = sum of palmitoleic, oleic, and gadoleic acids; ΣPUFA = sum of linoleic and linolenic acids; ΣPUFA n-3 = linolenic acid; ΣPUFA n-6 = linoleic acid.

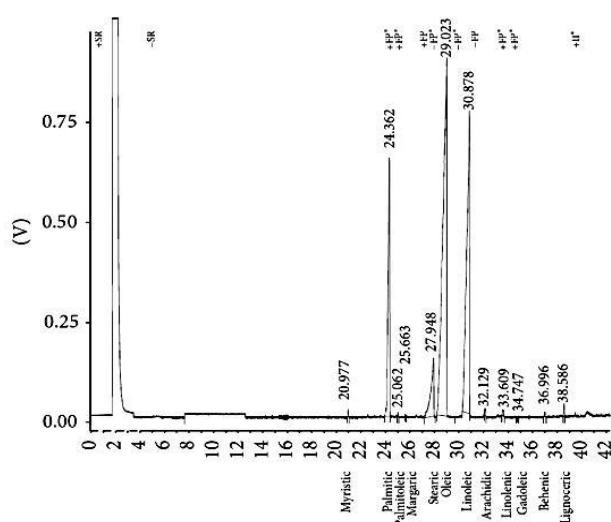


FIGURE 1: Chromatogram of FAME of a sample of argan oil.

≤ 0.2. The only exception was α-linolenic acid (C18:3 n-3), since slightly higher values than that established (≤0.3) were found for 11 samples.

Total unsaturated FA (MUFA + PUFA) in virgin argan oils composed 80% of the total FA, in accordance with previous bibliographic data [2, 8, 16, 17]. These fractions corresponded, almost entirely, to oleic and linoleic acids, respectively (average values of 45.6% of oleic acid and 34.6% of linoleic acid). Palmitic acid and stearic acid (12.7 and 5.83% on average, resp.) represented the greatest proportion of SFA in argan oil. In previous studies by our research group including samples of virgin argan oil of very different quality

(extra virgin, fine virgin, ordinary virgin, and lampant) showed oleic acid contents ranging from 36.50 to 47.70% [18].

The clinical relevance and the nutritional value of oleic acid have been extensively described and it is known to have hypocholesterolemic and hypotensive effects [1]. Moreover, argan oil promotes a proper supply of n-6 PUFA, mainly represented by the linoleic acid, precursor of the n-6 series with important pharmacological properties and protective effects against degenerative diseases, such as cardiovascular disease and cancer [19]. It is estimated that 17 to 21g of argan oil are sufficient to meet the daily needs of linoleic acid [20]. However, only small quantities of n-3 PUFA are provided by argan oil (content up to 0.50% of α-linolenic acid has been found in argan oils from the present assay) and therefore argan oil feeding should be supplemented by an extra supply of n-3 FA. Hilali et al. [8] reported proportions of 0.030–0.10% of α-linolenic acid and Harhar et al. [21] of 0.10–0.20%. Due to the poor linolenic acid content, the n-6/n-3 ratio of virgin argan oil is very high. Because of its FA composition and the elevated presence of minor compounds such as γ-tocopherol, several studies have confirmed the antiatherogenic and hypotensive effects of the argan oil, which can be used for reducing cardiovascular risks [5].

3.2. Fatty Acid Profile in Other Vegetable Edible Oils. Fatty acid composition and the related sums and ratios of the other oils analyzed in the present study are presented in Tables 3 and 4, respectively. Dubois et al. [12] classified vegetable oils according to their FA profiles into different classes and subclasses. Following this classification, four oils of our study may be included in the MUFA class: almond, avocado, extra virgin olive oil, and argan oil. Within this group, the first three belong to the MUFA subclass (>60%), specially rich in oleic acid, with contents ranging from 60.6% (avocado) to

TABLE 3: Fatty acid composition (%) in edible vegetable oils*.

	Myristic C14:0	Palmitic C16:0	Palmitoleic C16:1	Margaric C17:0	Stearic C18:0	Oleic C18:1 n-9	Linoleic C18:2 n-6	Arachidic C20:0	Linolenic C18:3 n-3	Gadoleic C20:1 n-9	Behenic C22:0	Lignoceric C24:0
Almond oil	0.02 ^a	6.73 ^{ab}	0.48 ^a	0.05 ^{ab}	1.78 ^{ab}	66.69 ^{ef}	23.9 ^b	0.11 ^{ab}	0.14 ^a	ND	0.07	0.03 ^a
Wheat germ oil	0.12 ^{ab}	21.1 ^e	0.12 ^a	0.09 ^{ab}	2.79 ^{abc}	15.84 ^a	53.0 ^d	1.73 ^e	4.68 ^b	0.24 ^{ab}	0.04	0.20 ^{ab}
Sunflower oil	0.05 ^{ab}	4.98 ^a	0.10 ^a	0.04 ^{ab}	3.24 ^{abc}	53.11 ^d	37.8 ^c	0.10 ^{ab}	0.28 ^a	0.04 ^a	0.03	0.22 ^{ab}
Linseed oil	ND	5.88 ^{ab}	0.03 ^a	0.02 ^a	3.10 ^{abc}	20.50 ^{ab}	15.0 ^{ab}	0.06 ^{ab}	55.2 ^d	0.04 ^a	0.05	0.10 ^a
Walnut oil	0.13 ^{bc}	8.02 ^{ab}	0.23 ^a	0.18 ^{ab}	4.64 ^{cd}	26.31 ^b	60.4 ^{de}	0.02 ^a	0.05 ^a	0.04 ^a	0.03	0.01 ^a
Avocado oil	0.14 ^{bc}	16.3 ^d	4.59 ^b	0.34 ^b	1.50 ^a	60.61 ^{de}	14.7 ^{ab}	0.36 ^{abcd}	0.73 ^a	0.09 ^a	0.11	0.50 ^b
Sesame oil	ND	9.82 ^{bc}	0.11 ^a	0.02 ^a	5.96 ^d	41.12 ^c	41.8 ^c	0.30 ^{abcd}	0.51 ^a	0.12 ^a	0.10	0.18 ^{ab}
Grape seed oil	0.05 ^{ab}	7.66 ^{ab}	0.03 ^a	0.11 ^{ab}	4.53 ^{cd}	17.65 ^{ab}	69.3 ^e	0.16 ^{abc}	0.33 ^a	0.02 ^a	0.04	0.13 ^a
Soybean oil	0.06 ^{ab}	9.17 ^{abc}	0.08 ^a	0.08 ^{ab}	3.81 ^{bc}	24.44 ^{ab}	54.0 ^d	0.05 ^a	8.03 ^c	ND	0.05	0.24 ^{ab}
Pumpkin oil	0.22 ^c	15.6 ^d	0.15 ^a	ND	3.38 ^{abc}	24.52 ^{ab}	54.7 ^d	0.64 ^d	0.43 ^a	ND	0.17	0.16 ^{ab}
Olive oil	ND	13.6 ^{cd}	0.50 ^a	ND	3.28 ^{abc}	75.40 ^f	5.50 ^a	0.55 ^{cd}	0.78 ^a	0.42 ^b	ND	0.03 ^a
Argan oil	0.12 ^b	12.7 ^{cd}	0.08 ^a	0.02 ^a	5.83 ^d	45.59 ^c	34.6 ^c	0.40 ^{bcd}	0.35 ^a	0.17 ^a	0.05	0.07 ^a
SEM	0.0064	0.2575	0.0298	0.0173	0.1153	0.5024	0.5200	0.0233	0.1665	0.0152	0.0084	0.0183
P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0070	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	NS	<0.001

*Values are expressed as means \pm SEM.

^{a,b,c,d,e,f}Different superscripts indicate significant differences between oils (one-way ANOVA followed by Tuckey test, $P < 0.05$).

ND: not detected. NS: not significant ($P > 0.05$).

TABLE 4: Sum of fatty acids in edible vegetable oils*.

	Σ SFA	Σ MUFA	Σ PUFA	Σ PUFA n-3	Σ PUFA n-6	SFA/PUFA	n-6/n-3 ratio
Almond oil	8.79 ^a	67.1 ^{ef}	24.0 ^b	0.14 ^a	23.9 ^b	0.37 ^{ab}	171 ^{ab}
Wheat germ oil	26.1 ^e	16.2 ^a	57.7 ^d	4.68 ^b	53.0 ^d	0.48 ^{ab}	11.3 ^a
Sunflower oil	8.65 ^a	53.2 ^d	38.1 ^c	0.28 ^a	37.8 ^c	0.23 ^{ab}	135 ^{ab}
Linseed oil	9.20 ^a	20.6 ^{ab}	70.2 ^e	55.2 ^d	15.0 ^{ab}	0.13 ^a	0.27 ^a
Walnut oil	13.3 ^{ab}	26.6 ^b	60.4 ^{de}	0.05 ^a	60.4 ^{de}	0.22 ^{ab}	1208 ^c
Avocado oil	19.2 ^{cd}	65.3 ^e	15.5 ^{ab}	0.73 ^a	14.7 ^{ab}	1.40 ^c	20.1 ^a
Sesame oil	16.4 ^{bcd}	41.4 ^c	42.3 ^c	0.51 ^a	41.8 ^c	0.39 ^{ab}	81.9 ^{ab}
Grape seed oil	12.7 ^{ab}	17.7 ^{ab}	69.6 ^e	0.33 ^a	69.3 ^e	0.18 ^{ab}	210 ^b
Soybean oil	13.5 ^{abc}	24.5 ^{ab}	62.0 ^{de}	8.03 ^c	54.0 ^d	0.22 ^{ab}	6.72 ^a
Pumpkin oil	20.2 ^d	24.7 ^{ab}	55.1 ^d	0.43 ^a	54.7 ^d	0.37 ^{ab}	127 ^{ab}
Olive oil	17.5 ^{bcd}	76.3 ^f	6.28 ^a	0.78 ^a	5.50 ^a	2.79 ^d	7.05 ^a
Argan oil	19.2 ^d	45.8 ^{cd}	35.0 ^c	0.35 ^a	34.6 ^c	0.55 ^b	98.9 ^{ab}
SEM	0.3152	0.5034	0.5825	0.1665	0.5200	0.0271	4.468
P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

*Values are expressed as means \pm SEM.

^{a,b,c,d,e,f}Different superscripts indicate significant differences between oils (one-way ANOVA followed by Tuckey test, $P < 0.05$).

Σ SFA = sum of myristic, palmitic, margaric, stearic, arachidic, behenic and lignoceric acids; Σ MUFA = sum of palmitoleic, oleic and gadoleic acids; Σ PUFA = sum of linoleic and linolenic; Σ PUFA n-3 = linolenic acid; Σ PUFA n-6 = linoleic acid.

75.4% (olive oil), that is, obviously, the most representative oil of this group. The MUFA content of olive oil does not differ from that of almond oil, which, in turn, is equal to avocado oil, being these three oils significantly higher from all the other oils of the present study. Almond oil may be included in the MUFA group, although it does not appear in previous studies of edible vegetable oils according to their

FA profile [12, 22]. Our results regarding virgin olive oil were similar to data from literature [23] and are in accordance with specifications of trade standards for olive oils defined by the International Olive Oil Council [14]. Olive oil FA composition has been considered as a parameter to characterize the different olive cultivars [24]. Within the MUFA group, argan oil was classified as MUFA + SFA + linoleic subclass, since

TABLE 5: Eigenvalues and standardized coefficients of the discriminant functions from the discriminant analysis^a.

	Functions					
	1	2	3	4	5	6
Eigenvalue	420.30	289.42	44.879	14.333	12.976	4.8675
% Variance	53.22	36.65	5.68	1.81	1.64	0.62
% Accumulated	53.22	89.87	95.55	97.36	98.00	99.62
Coefficients						
Myristic C14:0	0.7519	2.5080	0.2043	-0.1405	-0.8611	1.0247
Palmitic C16:0	11.8615	20.1977	-16.9402	-24.0943	-2.6487	-0.1141
Palmitoleic C16:1	0.2054	-0.0529	-0.8225	-2.6297	-0.1873	0.0954
Margaric C17:0	0.4672	0.3077	-0.2373	-1.1249	0.9900	-0.7060
Stearic C18:0	5.5797	9.7338	-7.1674	-9.8910	-1.0317	-0.0921
Oleic C18:1n9	23.6425	42.4694	-31.9515	-46.7608	-1.7847	1.4056
Linoleic C18:2n6	24.5615	44.4087	-31.6167	-48.231	-1.781	1.1727
Arachidic C20:0	2.2278	3.2195	-0.7927	-3.5122	0.9376	0.4712
Linolenic C18:3n3	9.4127	13.5853	-10.2911	-15.4278	-0.6935	0.4292
Gadoleic C20:1	0.7593	-0.3258	-0.2729	-0.3116	-0.1056	-0.7364
Behenic C22:0	0.4948	1.2594	-0.3754	-1.0258	0.0831	0.7488
Lignoceric C24:0	2.0479	3.4099	-2.2907	-1.7046	0.8047	0.0913

^aThe first six discriminant functions are shown.

average SFA and linoleic acid contents were higher than in the MUFA group/MUFA subclass, although differences do not reach statistical significance in all cases.

The remaining oils analyzed in the present study, grape seed, wheat germ, sunflower, linseed, walnut, sesame, soybean, and pumpkin oils, were oils from the PUFA group, according to Dubois et al. [12]. The PUFA content in this group ranged from 38% in sunflower to 70% in grape seed and linseed oils, with significant differences between the different oils. Grape seed oil belongs to a linoleic acid subclass, as it has 69.3% content of this FA, significantly higher than all the other oils of the present study and similar to previous reported data [12, 22]. Walnut oil was classified in the linoleic + SFA subclass and the highest ratio n-6/n-3 was found in this oil compared with all the other analyzed oils. Wheat germ, sunflower, sesame, soybean, and pumpkin oils were classified in the linoleic + MUFA subclass, since these oils, in addition to contain important proportions of linoleic acid, also have high amounts of MUFA, ranging from 16.2% (wheat germ) to 53.2% (sunflower). Sunflower oil analyzed in the present assay had much higher oleic acid and lower linoleic acid contents than conventional sunflower oils [13], but it was similar to other sunflower oils currently commercialized in the Spanish market [23]. Sesame oil, like argan oil, had oleic and linoleic acids as major FA, without significant differences of these two FA between both oils. Soybean and pumpkin oils have very similar amounts of MUFA, but soybean showed higher PUFA, due to its special content of linolenic acid (8% of total FA, significantly different from all the other oils of our study). Finally, the linseed oil is the only one included in the linolenic + MUFA subclass, with an exceptional content of 55.2% of linolenic acid and thus the lowest ratio n-6/n-3 (0.27) of the total of oils is analyzed. This FA is the precursor of long-chain

derivatives like EPA and DHA, and special effects of linseed oils on cardiovascular disease have been widely studied [24].

3.3. Results of the Discriminant Analysis. With the aim of studying the relationships among the oils under a statistical point of view, a multivariate discriminate analysis was applied. As mentioned, this analysis considers information of all the variables, which provide important information and may have effects on the relationships of oils. Moreover, the analysis establishes discriminating functions which can help predicting the type of oil by the values of all the FA represented in the independent variables.

Table 5 displays the eigenvalues obtained in the present analysis. An eigenvalue in discriminant analysis is the characteristic root of each function; that is, it is an indication of how well that function differentiates the groups, and the larger the eigenvalue is, the better the function differentiates the groups. As it is depicted in Table 5, with the three first functions, the 95.55% of the variance is explained. Table 5 also shows the standardized coefficients of the six first discriminating functions based on the values of the twelve FA analyzed, as discriminant variables. The relative magnitude of the different coefficients allows determining how the different variables affect the discrimination of the oils. Each function is defined by different coefficients, but it may be observed that the most important variables are linoleic and oleic acids, followed by palmitic, linolenic, and stearic acids.

The results of the discriminating analysis can be represented in charts that consist of the possibility to graphically represent the similarity of the type of oil on the basis of two or three dimensions (the discriminating functions). Graphical representation for three dimensions is depicted in Figure 2,

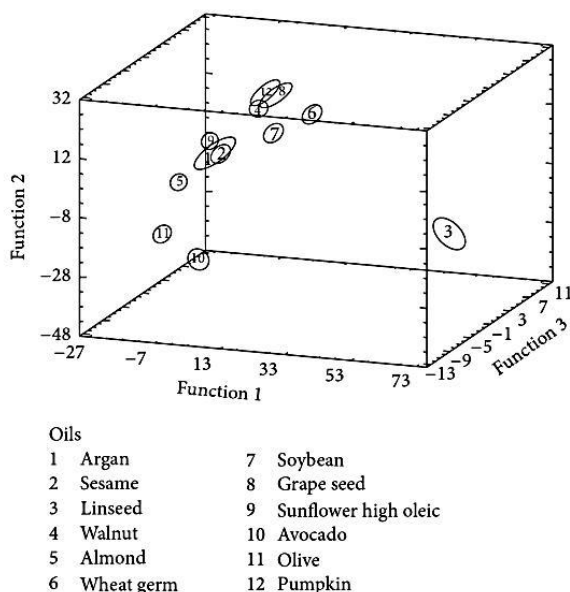


FIGURE 2: Similarity of the oils based on the first three discriminating functions of the discriminant analysis.

in accordance with the first three discriminating functions. To avoid overlapping derived from marking all the values, we have used an average value of the discriminant function for each one of the oils, that is, the centroid, which has been represented with different numbers. Similarity of objects in a multidimensional scaling is determined on the basis of the measure of distance, and this measure corresponded to the type of data. It must be taken into account that, even when two oils exhibit similarity in the content of a major FA, small differences in the percentage of a minor FA can completely change the characteristics of the oil [25]. From Figure 2 we can see that oils included in the MUFA group (argan, almond, avocado, and olive oils) are relatively close, where avocado and olive oils are the most similar oils. However, from the visual exploration it may be concluded that argan oil has closest relationships with two oils from the PUFA group: sesame and high oleic sunflower, particularly with sesame oil. There is also a close relationship between walnut, grape seed, and pumpkin oils, whereas linseed differs considerably from the other oils. In order to validate the classification method, it was applied to all the samples in accordance with their FA profile, and the predicted group (kind of oil) was correct in 100% of cases. This proves that this analysis predicts well the corresponding oil observed by means of the chosen predictor variables. The usefulness of the analysis has been previously ascertained by other authors to discriminate the geographical origin of olive oils by their fatty acid composition [26].

4. Conclusions

The fatty acid composition of edible oils is a very important aspect in marketing and human health. Virgin argan oil raises nowadays significant scientific and commercial interests

outside the Maghreb area, where it is consumed for centuries. In this study, similarities and differences between argan oil and other edible vegetable oils based on their fatty acid profile were established by the application of multivariate discriminant analysis. This method was proven to be a useful tool to study the relationships between oils according to the fat composition; moreover, the importance of the FA variables for the oils classification may be determined and similarities among oils may be easily visualized by graphical representation.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

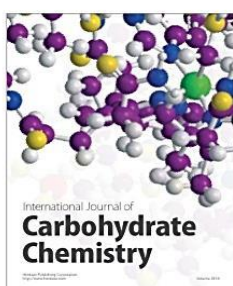
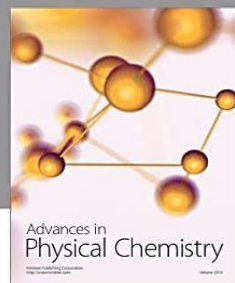
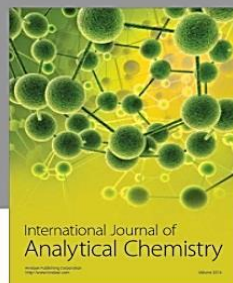
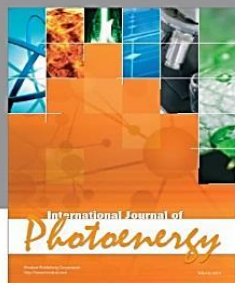
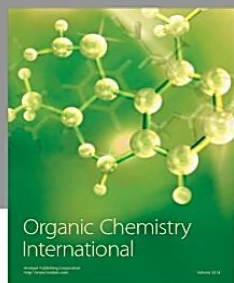
Acknowledgments

This work was supported by the research group AGR141 of Junta de Andalucía and a Project of Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada. The assays described are part of the doctoral thesis of Ascension Rueda, from the Official Doctoral Program "Nutrition and Food Sciences" of the Granada University.

References

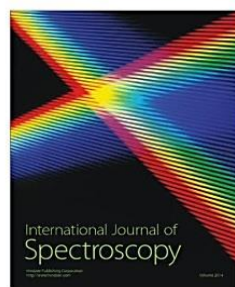
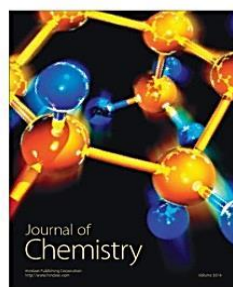
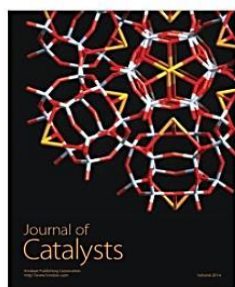
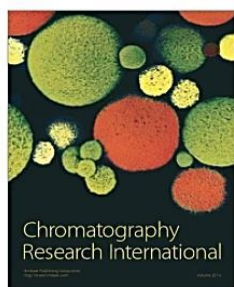
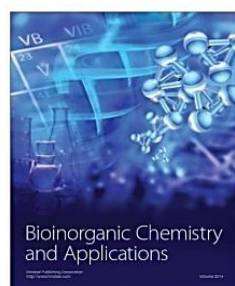
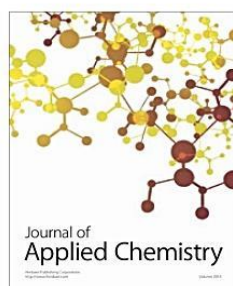
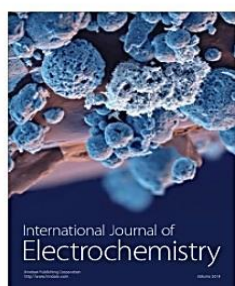
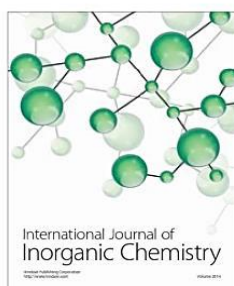
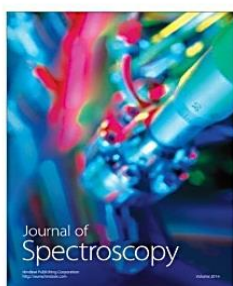
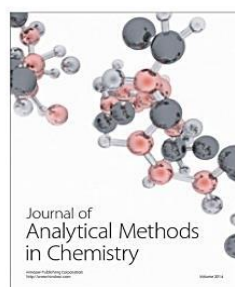
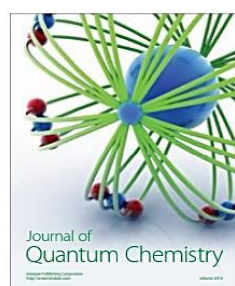
- [1] H. E. Monfalouti, D. Guillaume, C. Denhez, and Z. Charrouf, "Therapeutic potential of argan oil: a review," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 62, no. 12, pp. 1669–1675, 2010.
- [2] C. Cabrera-Vique, R. Marfil, R. Giménez, and O. Martínez-Augustín, "Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil—an edible oil with potential as a functional food," *Nutrition Reviews*, vol. 70, no. 5, pp. 266–279, 2012.
- [3] Z. Charrouf and D. Guillaume, "Should the amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health?" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 50, no. 5, pp. 473–477, 2010.
- [4] Norme Marocaine 08.5.090, *Huiles d'Argane. Specifications*, Ministre de l'Industrie, de l'Energie et des Mines, Rabat, Morocco, 2003.
- [5] M. Cherki, H. Berrougui, A. Drissi, A. Adlouni, and A. Khalil, "Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases?" *Pharmacological Research*, vol. 54, no. 1, pp. 1–5, 2006.
- [6] S. Sour, M. Belarbi, D. Khaldi et al., "Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans," *British Journal of Nutrition*, vol. 107, no. 12, pp. 1800–1805, 2012.
- [7] F. Khallouki, C. Younos, R. Soulimani et al., "Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 12, no. 1, pp. 67–75, 2003.
- [8] M. Hilali, Z. Charrouf, A. E. A. Souli, L. Hachimi, and D. Guillaume, "Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 2081–2087, 2005.
- [9] R. Marfil, C. Cabrera-Vique, R. Giménez, P. R. Bouzas, O. Martínez, and J. A. Sánchez, "Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil:

- Influence of the extraction method," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 16, pp. 7279–7284, 2008.
- [10] C. Venegas, C. Cabrera-Vique, L. García-Corzo, G. Escames, D. Acuña-Castroviejo, and L. C. López, "Determination of coenzyme Q 10, coenzyme Q 9, and melatonin contents in virgin argan oils: comparison with other edible vegetable oils," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 22, pp. 12102–12108, 2011.
- [11] J. Aranceta, C. Pérez, and J. Mataix, "Ingestas dietéticas de referencia, objetivos nutricionales y guías alimentarias," in *Libro Blanco de los Omega 3*, C. Pérez, A. Gil, and L. Serra, Eds., pp. 83–103, Editorial Médica Panamericana, Madrid, Spain, 2013.
- [12] V. Dubois, S. Breton, M. Linder, J. Fanni, and M. Parmentier, "Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 109, no. 7, pp. 710–732, 2007.
- [13] F. F. Ai, J. Bin, Z. M. Zhang et al., "Application of random forests to select premium quality vegetable oils by their fatty acid composition," *Food Chemistry*, vol. 144, pp. 472–478, 2014.
- [14] International Oil Council, "Applicable trade regulations to olive oil and olive residue oil," No. 3/Rev 2, 2006.
- [15] A. Cert, W. Moreda, and M. C. Pérez-Camino, "Methods of preparation of fatty acid methyl esters (FAME). Statistical assessment of the precision characteristics from a collaborative trial," *Grasas y Aceites*, vol. 51, no. 6, pp. 447–456, 2000.
- [16] Z. Charrouf, D. Guillaume, and A. Driouich, "The Argan tree, an asset for Morocco," *Biofutur*, vol. 220, pp. 54–56, 2002.
- [17] Z. Charrouf and D. Guillaume, "Argan oil: occurrence, composition and impact on human health," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 110, no. 7, pp. 632–636, 2008.
- [18] R. Marfil, C. Cabrera, and R. Gimenez, *Importancia Nutricional, Económica y Natural del Aceite de Argán (Argania spinosa)*, Fundación Euroárabe de Altos Estudios, Madrid, Spain, 2009.
- [19] S. M. Soel, O. S. Choi, M. H. Bang, J. H. Yoon Park, and W. K. Kim, "Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells in vitro and in vivo," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 18, no. 10, pp. 650–657, 2007.
- [20] M. Rahmani, "Composition chimique de l'huile d'argane vierge," *Cahiers Agricultures*, vol. 14, pp. 461–465, 2005.
- [21] H. Harhar, S. Gharby, B. Kartah, H. El Monfalouti, D. Guillaume, and Z. Charrouf, "Influence of argan kernel roasting-time on virgin argan oil composition and oxidative stability," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 66, no. 2, pp. 163–168, 2011.
- [22] N. Vingerling, M. Oseredczuk, L. Du Chaffaut, J. Ireland, and M. Ledoux, "Fatty acid composition of commercial vegetable oils from the French market analysed using a long highly polar column," *Oleagineux Corps Gras Lipides*, vol. 17, no. 3, pp. 185–192, 2010.
- [23] H. López, M. D. Ruiz, and C. Cabrera-Vique, "Composición y calidad nutritiva de los alimentos," in *Tratado de Nutrición*, A. Gil and M. D. Ruiz, Eds., pp. 249–279, Editorial Médica Panamericana, Madrid, Spain, 2010.
- [24] J. A. Tur, M. M. Bibiloni, A. Sureda, and A. Pons, "Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits," *British Journal of Nutrition*, vol. 107, no. 2, pp. 23–52, 2012.
- [25] T. Řezanka and H. Řezanková, "Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis," *Analytica Chimica Acta*, vol. 398, no. 2-3, pp. 253–261, 1999.
- [26] J. J. Sánchez Casas, E. O. Bueno, A. M. M. García, and M. M. Cano, "Study of fatty acid contents in monovariety oils elaborated from olives produced in Extremadura (Spain)," *Grasas y Aceites*, vol. 54, no. 4, pp. 371–377, 2003.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



3. Aplicación de métodos analíticos y quimiométricos en la caracterización del aceite de argán virgen extra y otros aceites comestibles. Papel de los polifenoles, los tocoferoles y la actividad antioxidante.

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Combination of analytical and chemometric methods as a useful tool for the characterization of extra virgin argan oil and other edible virgin oils. Role of polyphenols, tocopherols and antioxidant activity

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rueda, Ascensión; University of Granada, Food Science and Nutrition Seiquer, Isabel; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Nutrition Samaniego Sanchez, Cristina; Universidad de Granada, Nutricion y Bromatologia Olalla Herrera, Manuel; Facultad de Farmacia, Depto. de Nutricion y Bromatologia Martinez, Rafael; University of Granada, Dept. of Nutrition & Bromatology Lara, Luis; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Nutrition Cabrera, Carmen; University of Granada, Department of Nutrition and Bromatology

SCHOLARONE™
Manuscripts

1

2 **Combination of analytical and chemometric methods as a useful tool for the**
3 **characterization of extra virgin argan oil and other edible virgin oils. Role of**
4 **polyphenols, tocopherols and antioxidant activity**

5

6 Ascensión Rueda¹, Isabel Seiquer^{*,2}, Cristina Samaniego-Sánchez¹, Manuel
7 Olalla¹, Rafael Giménez¹, Luis Lara² and Carmen Cabrera-Vique¹

8 ¹ Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad
9 de Granada, Granada, Spain

10 ² Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación
11 Experimental del Zaidín (CSIC), Armilla, Granada, Spain

12

13 Correspondence: Dr. Isabel Seiquer, Departamento de Fisiología y Bioquímica de
14 la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del Jueves
15 s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

16 Tlf. +34-958572757

17 Fax: +34-958572753

18 E-mail address: iseiquer@eez.csic.es

19

20

21 **ABSTRACT**

22 Analysis of phenolic profile, tocopherol fractions and antioxidant activity in
23 conjunction with chemometrics techniques were used for accurate characterization
24 of extra virgin argan oil and other eight vegetable edible virgin oils (olive, soybean,
25 wheat germ, walnut, almond, sesame, avocado and linseed) and for establish
26 similarities between them. Phenolic profile and tocopherols were determined by
27 HPLC coupled to diode-array and fluorescence detectors, respectively, and
28 antioxidant properties by DPPH, ABTS and FRAP methods. Multivariate Factor
29 Analysis (MFA) and linear correlations were applied. Antioxidant activity was
30 positively correlated with nearly all polyphenols identified, but more strongly with
31 tyrosol and oleuropein ($P<0.001$), whereas negative correlations were found with
32 γ -tocopherol ($P<0.01$). MFA revealed that tocopherols, especially γ -fraction, most
33 strongly influenced the oil characterization. The phenolic compounds pinoresinol,
34 oleuropein, tyrosol and luteolin also contributed. Argan oil was the most similar to
35 walnut oil, followed by linseed and sesame oils. Olive, avocado and almond oils
36 showed close similarities.

37

38

39 **KEYWORDS:** extra virgin argan oil, phenolic profile, tocopherols, antioxidant capacity,
40 edible virgin oils, Multivariate Factor Analysis.

41

42 **INTRODUCTION**

43 Edible oils play a critical role among dietary components, due to their nutritional
44 value and pharmacological effects in the prevention of degenerative diseases,
45 such as atherosclerosis and cancer.¹ Currently there is a public interest in food
46 quality and the demand for oils of high quality and healthy properties has
47 increased. Argan oil, derived from argan forests in Morocco, was almost unknown
48 elsewhere until a few years ago, but is now being introduced into specialist
49 international markets as a healthy, luxury food.² This oil is harvested from the fruit
50 of *Argania spinosa* (L.), a tree endemic to SW Morocco, where it provides up to
51 25% of total dietary fat intake.²

52 Regulations were introduced in 2003 to define quality specifications and to
53 classify virgin argan oils into different categories, with extra virgin argan oil being
54 the highest quality commercialised.³ With the increasing availability of high-quality
55 edible virgin argan oil, its nutritional properties are arousing considerable interest.
56 Recent studies suggest it may play a significant role in the prevention of
57 cardiovascular diseases due to its antioxidant potential and its hypolipidaemic,
58 hypocholesterolaemic and antihypertensive effects.⁴ These nutritional properties
59 and the health benefits of argan oil have been reviewed in a recent paper.⁵

60 Polyphenols are essential components of edible oils due to their antioxidant
61 activity, effects against degenerative diseases, and health-giving properties, such
62 as anti-atherogenic, anti-microbial and anti-carcinogenic effects.⁶⁻⁷ Recent studies
63 have reported the total phenolic content and described polyphenolic compounds in
64 argan fruit⁸, but information on the phenolic profile of edible argan oil is scarce,
65 and, according to bibliographic data, nine phenolic compounds have been
66 identified in edible argan oil.^{5,9} The detection of phenolic compounds in argan oil is

67 considered a challenge to analysis because of their relatively low levels, which
68 preclude detection by methodologies applied to such compounds in olive oil,
69 where levels are higher.¹⁰

70 Vegetable oils, especially seed oils, are rich sources of tocopherols.
71 Published data reveal that virgin argan oil is rich in tocopherols, of which the major
72 fraction is the γ -analogue.¹¹⁻¹² It has been reported that γ -tocopherol may be a
73 more potent chemo-preventive and anti-inflammatory agent than α -tocopherol.^{5,13}

74 Edible vegetable oils contain a large variety of bioactive compounds with
75 interesting antioxidant properties, such as free radical scavengers and reducing
76 power. Phenolic compounds, together with tocopherols, are believed to play an
77 important part in the preservation and antioxidant capacities of vegetable oils.⁵
78 Similar nutritional qualities of argan and olive extra virgin oils have been
79 suggested by several authors on the basis of their fatty acid profile.¹⁴ However,
80 applying multivariate discriminant analysis to fatty acid profile of twelve vegetable
81 edible oils -including olive oil-, our research group has shown that argan oil was
82 closer to other oils such as sesame or high oleic sunflower.¹⁵ However, there is a
83 lack of comparative studies including chemometric techniques for studying
84 relationships of argan oil and other edible virgin vegetable oils according to their
85 minor components or their antioxidant properties. Chemometrics is the use of
86 mathematical and statistical methods to improve the understanding of chemical
87 information and to correlate quality parameters or physical properties to analytical
88 instrument data. Chemometric treatment of data has been applied for classifying
89 some edible oils according to their spectroscopic characteristics¹⁶ or
90 chromatographic profiles,¹⁷ and for detecting oils adulteration.¹⁸ Therefore, the
91 combination of analytical and chemometric techniques furnish a powerful tool to

92 monitor a large variety of parameters and may offer good results to characterize
93 edible oils.¹⁶

94 The present study has the following aims: 1) to analyse the phenolic profile
95 and tocopherols content of extra virgin argan oil and other virgin vegetable oils
96 (extra virgin olive, soybean, wheat germ, walnut, almond, sesame, avocado and
97 linseed oils); 2) to determine the antioxidant properties of the oils by analysing
98 their free radical scavenger and reducing power, and 3) to apply chemometric
99 analysis to highlight the similarities and differences among argan and other oils
100 according with the variables analysed, assessing the impact of these variables in
101 the oils characterization.

102

103 **MATERIALS AND METHODS**

104 **Samples.** Twelve samples of extra virgin argan oil produced in south-western
105 Morocco (Essaouria and Agadir regions) and obtained by the half-industrialized
106 method and cold pressed were purchased in gourmet and specialist stores from
107 Spain. Four samples of each one of the following virgin edible vegetable oils were
108 purchased in local stores: extra virgin olive, soybean, wheat germ, walnut, almond,
109 sesame, avocado and linseed. The oil samples were carefully handled to avoid
110 contamination and correctly stored and maintained at a temperature of 4°C, and
111 analysed in due time. All samples used for this study were commercial oils
112 available in Spanish shops, which, therefore, meet European standards of
113 marketing and packaging. In order to check the adequate quality and conservation
114 of the oils samples, the acid value (expresses as percentage of oleic acid),
115 peroxide index (expresses as milliequivalents of active oxygen per kg of oil) and
116 K_{270} extinction coefficient (calculated from absorption at 270 nm using a Perkin-

117 Elmer Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer, Waltham, Massachusetts, USA)
118 were measured, following the analytical methods of the European Union
119 Commission (Regulation EEC/2568/91) as described elsewhere.¹⁹

120

121 **Chemicals.** All chemicals were analytical reagent grade or higher purity unless
122 otherwise stated. Bidistilled deionized water was obtained from a Milli-Q
123 purification system (Millipore, Bedford, MA). Methanol, Folin-Ciocalteu reagent, 6-
124 hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-azinobis-(3-
125 ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
126 (DPPH), gallic acid and all phenolic standards were provided by Sigma-Aldrich
127 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) for the
128 FRAP method was obtained from Fluka Chemicals (Fluka Chemicals, Madrid,
129 Spain). Standards of α -, β -, γ - and δ -tocopherols, ethanol, methanol, n-hexane,
130 phosphoric acid and HPLC mobile phase were provided by Merck (Merck,
131 Darmstadt, Germany).

132

133 **Total polyphenol content determination.** Total polyphenol content in the virgin
134 oils was determined following the Folin-Ciocalteu colorimetric method as
135 described by Marfil et al.¹¹ with some modifications. Briefly, 10 g of oil were
136 dissolved in 10 mL of methanol/water (1:1, v/v), pH 2, shaken and centrifuged. The
137 supernatant was carefully removed, and the procedure was repeated twice. The
138 total volume was adjusted to 25 mL. Then, 2.5 mL of deionized water and 500 μ L
139 of Folin-Ciocalteu reagent were added to 500 μ L of the methanolic extract. The
140 mixture was allowed to stand for 5 min, after which 2 mL of a 10% aqueous
141 Na_2CO_3 solution was added and the final volume was adjusted to 10 mL with

142 bidistilled deionized water. The samples were allowed to stand for 90 min at room
143 temperature and absorbance was measured at 700 nm *versus* the blank in a using
144 Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer. Results for total polyphenol
145 content are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) kg⁻¹ against a
146 calibration curve of gallic acid. The calibration curve range was 0.25-7.5 µg mL⁻¹ (r
147 = 0.998).

148

149 **Individual Phenolic Compounds.** Pre-treatment of the oil sample is essential in
150 order to clean up the sample matrix and improve the extraction methods and thus
151 preconcentrate the polyphenols. Three different extraction procedures were
152 assayed in the present study, as follows: specific solid phase extraction with Sep-
153 Pak® Plus C18 cartridges,²⁰ liquid-liquid extraction using n-hexane and
154 methanol/water (60:40 v/v) as the solvent for extraction and purification,²¹ and
155 extraction with methanol/water, (80:20 v/v) according to the procedure described
156 by Montedoro et al.²² Finally, a modification of this latter method was selected as it
157 allowed the identification and quantification of up to 16 phenolic compounds.
158 Briefly, 10 mL of a solution of methanol 80% (methanol/water, 80:20 v/v) was
159 added to 10 g of oil and mixed for 1 h in an agitator (Bunsen AO-400, Madrid,
160 Spain) at 215 rpm and centrifuged at 8000 rpm for 15 min; the extraction was
161 repeated twice. After adjusting the volume to 25 mL with methanol 80%, the
162 methanolic extract was concentrated using a rotary evaporator to obtain a residue
163 of 0.5 mL. Finally the residue was recovered with methanol 80%, diluted up 5 mL
164 and stored at -20°C until analysis.

165 Determinations of individual phenolic compounds were carried out using
166 HPLC, following a modification of the method described by Escarpa et al.²³ A

167 Varian liquid chromatographic system equipped with a Varian 230 ternary pump,
168 Diode-Array detector, autosampler Variant 410 and column conditioning module
169 Varian 500. TotalChrom 6.2 software was used. The column was a C 18 (250 x
170 4.6 mm, 5 μm particle size) (Teknokroma, Barcelona, Spain). The mobile phase A
171 consisted of bidistilled water/phosphoric acid (1%) and mobile phase B of
172 methanol 100% at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} , maintained for 60 min. The mobile
173 phases and samples were previously filtered through a 0.45 μm membrane, and
174 degassed ultrasonically prior to use. After this, 10 μL of the extract was injected.

175 Chromatographic peaks were identified by comparing their retention time
176 and UV spectrum with the reference standard solutions (1 mg mL^{-1}). Three
177 determinations of each oil sample were made.

178 The recoveries of the phenolics were calculated as the percentage from the
179 known amount of standard added to a refined vegetable oil. Recovery values
180 ranged from 96.43 to 100.62 % (see supporting information).

181

182 **Tocopherols.** Individual tocopherols were quantified as previously described by
183 Marfil et al.¹¹ by a HPLC system equipped with a fluorescence detector and an
184 analytical column (250 nm x 4 mm) with 5 μm silica particle size (Lichrosorb SI 60,
185 Merck) following the UNE-EN ISO 9936-2006 Standard Method, according to
186 external standards of α -, β -, γ -, and δ -tocopherols.

187

188 **Antioxidant capacity.** Total antioxidant capacity was determined using ABTS,
189 DPPH and FRAP assays, according to the procedure previously reported by Marfil
190 et al.¹¹, using a Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer.
191 Determinations were carried out in the methanolic extract of the samples

192 described for the total polyphenol content. ABTS and DPPH methods were used to
193 estimate the radical scavenging activity of the samples and the FRAP assay to
194 measure the ferric reducing ability. Trolox solutions were used for calibration
195 curves and the results were expressed as mM equivalents of Trolox per kg of
196 sample.

197

198 **Chemometric analysis.** The results obtained are expressed as mean values with
199 standard deviation (SD). The relationships of the phenolic compounds and the
200 tocopherols content with the results of the antioxidant activity tests for the different
201 oils were evaluated by computing the relevant correlation coefficient (Pearson
202 linear correlation) at the $P < 0.05$ confidence level. Data were also assessed by
203 Multivariate Factor Analysis (MFA) to evaluate similarities and differences between
204 the oils according to the parameters analysed (phenolic profile, tocopherol content,
205 antioxidant activity). All statistical analyses were carried out using SAS statistical
206 software.²⁴

207

208 **RESULTS AND DISCUSSION**

209 **Acid value, peroxide index and K_{270} .** Results of the quality parameters
210 determined in the oil samples involved in the present study are shown in Table 1.
211 All the argan oil samples met the required values of acidity, peroxide index and
212 K_{270} for the “extra-virgin argan oil” category, according to the standard NM
213 08.5.090.³ In the same manner, in the other edible vegetable oils analyzed these
214 quality parameters were within the ranges established by the International
215 Regulations.^{25,26}

216

217 **Total polyphenol content and phenolic profile.** The average total polyphenol
218 content in the extra virgin argan oil samples was 23.2 mg GAE kg⁻¹; however, a
219 large degree of variability among samples was observed, with values ranging from
220 6.2 to 75.1 mg GAE kg⁻¹. Different values of total phenolics have been reported in
221 other studies of argan oils, such as 13.2 mg kg⁻¹ by Rojas et al.⁹ and 69.2 mg/kg
222 by Marfil et al.¹¹ According to our results, virgin argan oil presented a higher total
223 polyphenol content than did most of the other virgin vegetable oils studied in the
224 present assay, such as linseed (17.1 ± 0.6 mg kg⁻¹), walnut (10.6 ± 0.6 mg kg⁻¹),
225 almond (0.85 ± 0.44 mg kg⁻¹), avocado (0.46 ± 0.01 mg kg⁻¹) and soybean oil (non-
226 detected). Only extra virgin olive oil (388 ± 86 mg kg⁻¹), sesame oil (83.3 ± 3.9 mg
227 kg⁻¹) and wheat germ oil (61.5 ± 0.4 mg kg⁻¹) presented higher total polyphenol
228 content than argan oil.

229 Little information is available about the phenolic composition of virgin argan
230 oil.^{5,9,27} Due to the low sensitivity of conventional extraction methods, some
231 authors have failed to detect argan oil phenolic compounds using HPLC.¹² The
232 only polyphenols identified in argan oils in preliminary studies by Chimi et al.²⁸
233 were caffeic acid and oleuropein. When the phenolic composition in argan oil was
234 analysed by Rojas et al.⁹ using GC-MS spectroscopy the following six compounds
235 were identified in the oils: 3-hydroxypyridine (3-pyridinol), 6-methyl-3-
236 hydroxypyridine, catechol, resorcinol, 4-hydroxy benzyl alcohol and tyrosol.
237 According to Khallouki et al.,²⁹ the phenolic components of argan oil detected by
238 GC-MS are vanillic acid, tyrosol, ferulic acid, syringic acid, hydroxybenzoic acid,
239 dihydroxibenzoic acid and vanillin. The method used in the present study allowed
240 the identification of the following compounds, in addition to those already identified
241 by Khallouki et al.²⁹: gallic acid, hydroxytyrosol, hydroxyphenylacetic acid, caffeic

242 acid, p- and o- isomers of vanillin and coumaric acids, pinoresinol and quercetin.
243 Therefore, a total of 16 compounds were identified and quantified in argan oil,
244 some of them for the first time (Table 2). Curiously, oleuropein was not detected
245 by Rojas et al.⁹ and in the present study.

246 Among the phenolic compounds quantified in the extra virgin olive oil
247 samples, two, oleuropein and luteolin were identified only in this oil (Table 2).
248 Oleuropein, pinoresinol, tyrosol, ferulic acid and hydroxytyrosol were the most
249 abundant compounds found in the olive oils, which is in accordance with previous
250 bibliographic data.^{7,10,30} The high amounts of the lignan pinoresinol detected in the
251 virgin olive oil samples are in accordance with the findings of Andjelkovic et al.³⁰
252 for olive oil from Spanish origin. In the present assay, pinoresinol was identified in
253 extra virgin argan oil for the first time. This compound is assumed to have
254 antioxidant and phytoestrogenic activities, which may be beneficial for human
255 health.³¹ To the best of our knowledge, the present study is the first to extensively
256 describe and compare the composition of polyphenols in virgin argan oils,
257 compared with other edible virgin vegetable oils.

258

259 **Tocopherol content.** The total tocopherol content of the analysed samples of
260 virgin argan oil ranged from 384 to 511 mg kg⁻¹ (mean value 454 ± 33 mg kg⁻¹).
261 Very similar values were found by Cayuela et al.¹² and Matthäus et al.³² in assays
262 studying the influence of seed processing conditions, method of extraction and
263 geographic origin in argan oil tocopherol content. Marfil et al.¹¹ reported average
264 total tocopherol values of 498 and 535 mg kg⁻¹ and only a few authors have found
265 higher values, of up to 775 mg kg⁻¹, in argan oil samples.^{33,34}

266 Among the minor constituents, tocopherol constitutes the main difference
267 between argan oil and other edible oils. Total tocopherol content in extra virgin
268 argan oil was 2.5 fold higher than that found for extra virgin olive oil ($192 \pm 9 \text{ mg}$
269 kg^{-1}) and was also higher than in avocado ($231 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$), linseed ($342 \pm 1 \text{ mg}$
270 kg^{-1}), sesame ($434 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1}$) and walnut oils ($436 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$), although it was
271 lower than in some other edible vegetable oils analysed, such as almond (561 ± 4
272 mg kg^{-1}), soybean ($602 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$), and wheat germ oil, which presented the
273 highest value ($1430 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1}$).

274 The contents of the different fractions of tocopherols in the virgin oils
275 analysed in the present study are detailed in Table 3. Corroborating previous
276 studies^{11,29} γ -tocopherol was found to be the major fraction in virgin argan oil (78%
277 of the total), although other authors have described slightly different values,
278 ranging from 69 %³⁰ to 87%.³⁴ The high value of the argan oil γ -fraction was never
279 surpassed by other oils, except by sesame oil (380 and 356 mg kg^{-1} in sesame
280 and argan oils, respectively).

281 The γ -fraction is the main component in virgin argan oil tocopherols,
282 whereas the α -fraction is the major one in other edible oils, such as wheat germ oil
283 (52% of total tocopherols), almond oil (86%) and olive oil (88%). It has been
284 shown that γ -tocopherol, but not α -tocopherol, has anti-inflammatory properties,³⁵
285 moreover, it has been related with a lower incidence of cardiovascular disease and
286 bowel intestinal disease.^{13,35} It has been proposed that diets providing substantial
287 amounts of γ -tocopherol could protect against reactive oxygen species-mediated
288 inflammation.³⁶

289

290 **Antioxidant capacity.** Table 4 shows the results obtained for the antioxidant
291 capacity of the oils studied. It is well known that, in view of the complexity of
292 oxidation processes, several antioxidant tests should be conducted. However,
293 methods for measuring antioxidant activity are extremely dependent on the assay
294 conditions used and the substrates or products monitored, and thus, the data
295 obtained are difficult to compare and interpret.³⁷ Methods measuring the ability of
296 antioxidants to intercept free radicals (such as DPPH[•] and ABTS^{•+}) or to reduce Fe
297 (FRAP assay) have been widely used to determine the antioxidant properties of
298 oils.^{11,38,39} Little is known about antiradical scavenging activity or the reducing
299 power of edible argan oil,¹¹ although data of DPPH and ABTS assays obtained
300 from argan fruit extracts and different argan fruit parts were reported recently.^{28,40}
301 Among the vegetable oils studied in the present paper, extra virgin olive oil
302 showed the highest antioxidant potential, by the three methods used. According to
303 the ABTS test, argan oil was second and sesame was third, whereas the DPPH
304 radical scavenging activity of argan oil, walnut, linseed, sesame and soybean oils
305 was similar (around 0.20 mmol Trolox kg⁻¹ oil). The FRAP assay revealed a very
306 high reducing power for extra virgin olive oil, more than 4 fold higher than any of
307 the other oils analysed (Table 4). Espín et al.³⁹ studied the free radical scavenger
308 ability of 14 edible oils from different sources using the DPPH assay and observed
309 that the antioxidant potential in the methanolic fraction varied as follows: safflower
310 ≈ sesame > rapeseed > walnut ≈ olive > linseed > almond oils. Other comparative
311 studies using the same method in different oils (olive oil, soybean, sunflower and
312 corn oils) have shown that olive oil has the highest antioxidant potential, followed
313 by soybean, sunflower and corn oils.⁴¹
314

315 **Exploratory data analysis.** Antioxidant activity can be measured only indirectly,
316 on the basis of its effects, and methods usually evaluate the overall activity of all
317 the antioxidants in the sample, both known and unknown. Statistical methods give
318 us the opportunity of establish relationships between antioxidant properties and
319 the content of the antioxidant compounds analysed. A positive correlation between
320 total phenolic content and antioxidant activity has been reported in many different
321 foods, such as fruit and vegetables,⁴² wine,⁴³ olive oil^{38,44} and different vegetable
322 oils.⁴¹In this line, we found strong correlations between total phenolic compounds
323 determined by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity of the oils
324 ($r=0.975$, $r=0.779$, $r=0.984$ for DPPH, ABTS and FRAP assays, respectively, all
325 $P<0.001$). Tocopherols also could contribute to antioxidant activity, but no
326 significant correlations were observed in the present assay between total
327 tocopherols in the oils and DPPH, ABTS or FRAP values, which accords with
328 previous studies performed in olive oils.⁴⁴

329 Correlations between antioxidant activity and individual phenolic and
330 tocopherol fractions were also evaluated in our study (Table 5). DPPH, ABTS and
331 FRAP values were highly correlated with the content of all the phenolic
332 compounds quantified, except with gallic and caffeic acids. Hydroxybenzoic,
333 hydroxyphenylacetic and vanillic acids were only correlated with ABTS values, and
334 a negative correlation was found between quercetin content and FRAP values.
335 Apart from the correlations found for oleuropein and luteolin, which were only
336 detected in olive oil, the strongest correlations with antioxidant tests were
337 observed for tyrosol and pinoresinol. Other authors have also observed high
338 correlations between ABTS and FRAP values with hydroxytyrosol, oleuropein and
339 tyrosol contents in extra virgin olive oils.⁴⁴ With respect to tocopherols, negative

340 correlations were found between the γ -fraction and DPPH and FRAP results, and
341 no significant correlation was observed with the other homologues.

342 A first MFA was performed to explore similarities and differences among the
343 different oils according with all the different variables studied, and the contribution
344 of these variables to the characterization of the oils. The main reason for using
345 MFA is to reduce the number of variables that should be included in the models,
346 eliminating those parameters that do not provide relevant information for the
347 characterization. In the MFA performed with all the variables analysed (individual
348 polyphenols, tocopherol fractions and antioxidant assays), Factor 1 and Factor 2
349 explained 67.6% and 29.8% of the variance, respectively (97.4% of the
350 accumulated variance). The loadings of Factors 1 and 2 are shown in Table 6. The
351 individual compound with the greatest influence for Factor 1 was γ -tocopherol,
352 followed by oleuropein, luteolin, pinoresinol and tyrosol, and the antioxidant activity
353 tests with the greatest loading were DPPH and FRAP. Factor 2 was mainly
354 affected by the δ -tocopherol fraction, followed by homologous β - and α -, the
355 phenolic compounds dihydroxybenzoic and syringic acids and, to a lesser extent,
356 the ABTS values.

357 The graphic representation of Factors 1 and 2 in Table 6 illustrates potential
358 relationships between the oils according to the main variables affecting each factor
359 (Figure 1). Taking into account Factor 1, olive, almond and avocado oils are
360 located on the extreme right-hand side of the graph, while wheat germ, argan,
361 walnut, linseed and sesame are grouped on the left-hand side. Argan and walnut
362 oils show the greatest proximity. Since the variable with the greatest loading for
363 Factor 1 is γ -tocopherol, the oils are grouped according to their content in this
364 respect, and the oil samples located in the positive score area have the lowest

365 amounts of γ -tocopherol, although they have very different antioxidant activities.
366 When Factor 2 is considered, a clear separation between wheat germ and
367 soybean oils (in the upper-side of the graph) and the other oils can be seen. Thus,
368 the positive score area of Factor 2 is related with increasing amounts of δ -
369 tocopherol, as this variable exerts the greatest influence. This entire means that,
370 when taking into account all the variables analysed, tocopherols play the most
371 important role in the discrimination of the different types of oils, whereas phenolic
372 compounds and antioxidant activity measured by DPPH, ABTS or FRAP methods
373 have a weaker influence.

374 To further examine the relationship between phenolic compounds and
375 antioxidant activity tests in the discrimination of oils, another MFA was performed,
376 only considering these variables and avoiding the contribution of tocopherols. In
377 this second analysis, Factor 1 and Factor 2 accounted for 82.30% and 9.93% of
378 the variance and their loadings are shown in Table 7. The main contributing
379 variables for Factor 1 were pinoresinol, oleuropein, tyrosol, DPPH, luteolin and
380 FRAP. This is consistent with the strong correlation coefficients observed between
381 the above-mentioned phenols and the DPPH and FRAP values. In the graphic
382 representation of this analysis (Figure 2) extra virgin olive oil is on the right-hand
383 side of the graph, clearly separated from the other oils, including argan oil, which
384 are on the left. Therefore, according to the phenolic profile and the antioxidant test,
385 extra virgin argan oil is similar to all the oils analyzed in the present assay, except
386 extra virgin olive oil, which was completely different.

387 We consider that this paper reports relevant information on the phenolic profile,
388 tocopherol fractions content and antioxidant activity of extra virgin argan oil and
389 eight other virgin edible vegetable oils. The optimised analytical method used to

390 determine the phenolic profile enabled us to quantify a large number of
391 compounds in the samples, some of which are described for the first time in extra
392 virgin argan oil. The MFA revealed that tocopherol, in particular the γ -fraction, is
393 the variable with the strongest influence in discriminating the different oils. Among
394 the phenolic compounds, pinoresinol, oleuropein, tyrosol and luteolin seemed to
395 most strongly affect the discrimination of the oils, together with the DPPH and
396 FRAP values. According to the variables analysed in the present study, argan oil
397 presented the greatest similarity with walnut oil, followed by linseed and sesame
398 oils.

399

400 **ACKNOWLEDGEMENTS**

401 This work was supported by the research group AGR141 of Junta de Andalucía
402 and a Research Project of The University of Granada. The assays described are
403 part of the doctoral thesis of Ascension Rueda, under the Doctoral Program
404 “Nutrition and Food Sciences” of the University of Granada.

405

406 **SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE**

407 Analytical characteristics of the method applied for the detection of polyphenols
408 (detection limit, quantification limit and recovery of each compound). This material
409 is available free of charge via the Internet at the <http://pubs.acs.org>.

410

411 **REFERENCES**

412 (1) Bulló, M.; Lamuela-Raventos, R.; Salas, J. Mediterranean diet and oxidation:
413 nuts and olive oils as important sources of fat and antioxidants. *Curr. Top.*
414 *Med. Chem.* **2011**, *11*, 1797-1810.

- 415 (2) Charrouf, Z.; Guillaume, D. Should the Amazigh diet (regular and moderate
416 argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Rev. Food*
417 *Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 473-477.
- 418 (3) Service de Normalisation Industrielle (Snima): huiles d'arganes. Spécifications.
419 Norme Marocaine NM 08.5.090. 2003, Snima, Rabat, Morocco.
- 420 (4) Cherky, M.; Berrougui, H.; Drissi, A.; Adlouni, A.; Khalil, A. Argan oil: Which
421 benefits on cardiovascular diseases? *Pharm. Res.* **2006**, *54*, 1-6.
- 422 (5) El Abbassi, A.; Khalid, N.; Zbakh, H.; Ahmad, A. Physicochemical
423 characteristics nutritional properties and health benefits of argan oil: a review.
424 *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 1401-1414.
- 425 (6) Visioli, F.; Poli, A.; Gall, C. Antioxidant and other biological activities of phenols
426 from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 65-75.
- 427 (7) Suárez, M.; Macià, A.; Romero, M. P.; Moltiva, M. J. Improved liquid
428 chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of
429 phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1214*, 90-99.
- 430 (8) El Monfalouti, H.; Charrouf, Z.; Belviso, S.; Ghirardello, D.; Scursartone, B.;
431 Guillaume, D.; Clément, D.; Zeppa, G. Analysis and antioxidant capacity of the
432 phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels). *Eur. J.*
433 *Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114*, 446-452.
- 434 (9) Rojas, L. B.; Quideau, S.; Pardon, P.; Charrouf, Z. Colorimetric evaluation of
435 phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of
436 alimentary and cosmetic argan oil and press cake. *J. Agric. Food Chem.* **2005**,
437 *53*, 9122-9127.
- 438 (10) Bayram, B.; Ozcelik, B.; Schultheiss, G.; Franks, J.; Rimbach, G. A validated
439 method for the determination of selected phenolics in olive oil using high-

- 440 performance liquid chromatography with colorimetric electrochemical detection
441 and a fused-core column. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1663-1669.
- 442 (11) Marfil, R.; Giménez, R.; Martínez, O.; Bouzas, P. R., Rufián-Henares, J. A.;
443 Mesías, M.; Cabrera-Vique, C. Determination of polyphenols, tocopherols, and
444 antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *Eur. J. Lipid*
445 *Sci. Technol.* **2011**, *113*, 886–893.
- 446 (12) Cayuela, J. A.; Rada, M.; Pérez-Camino, M. C.; Benaissa, M.; Abdelaziz, E.;
447 Guinda, A. Characterization of artisanally and semiautomatically extracted
448 argan oils from Morocco. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 1159-1166.
- 449 (13) Devaraj, S.; Jialal, I. Failure of vitamin E in clinical trials: Is gamma-tocopherol
450 the answer? *Nutr. Rev.* **2005**, *63*, 290-293.
- 451 (14) El Monfalouti, H.; Guillaume, D.; Denhez, C.; Charrouf, Z. Therapeutic
452 potential of argan oil: a review. *J. Pharmacy Phamacol.* **2010**, *62*, 1669-1675
- 453 (15) Rueda, A.; Seiquer I.; Olalla, M.; Gimenez, R.; Lara, L.; Cabrera-Vique, C.
454 Characterization of fatty acid profile of argan oil and other edible vegetable oils
455 by gas chromatography and discriminant analysis. *E- J. Chem.* **2014**,
456 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/843908>.
- 457 (16) Luna, A. S.; Da Silva, A. P.; Ferré, J.; Boqué, R. Classification of edible oils
458 and modeling of their physic-chemical properties by chemometric methods
459 using mid-IR spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A.* **2013**, *100*, 109-114.
- 460 (17) Eddib, O.; Nickless, G. Elucidation of olive oil classification by chemometrics.
461 *Analyst.* **1987**, *112*, 391-395.
- 462 (18) El-Abassy, R. M.; Donfack, P.; Materny, A. Visible Raman spectroscopy for
463 the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of
464 adulteration, *J. Raman Spectr.* **2009**, *40*, 1284-1289.

- 465 (19) Marfil, R.; Cabrera-Vique, C.; Giménez, R.; Bouzas, P.R.; Martínez, O.;
466 Sánchez, JA. Metal content and physicochemical parameters used as quality
467 criteria in virgin argan oil: influence of the extraction method. *J. Agric. Food*
468 *Chem.* **2008**, *56*, 7279-7284
- 469 (20) García-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferraro, C.; Vázquez-
470 Martín, A.; Menéndez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.
471 Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive
472 oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS
473 method. *J. Pharm. Biomed. A.* **2010**, *51*, 416-429.
- 474 (21) Zeineb, A.; Salvatore, F.; Giovanni, O.; Anna, R.; Chiara, R. Analysis of
475 phenolic compounds in extra virgin olive oil by using reversed-phase capillary
476 electrochromatography. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1643–1650.
- 477 (22) Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. Simple and hydrolyzable
478 phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and
479 quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*
480 **1992**, *40*, 1571-1576.
- 481 (23) Escarpa, A.; Morales, M. D.; Gonzalez, M. C. Analytical performance of
482 commercially available and unavailable phenolic compounds using real
483 samples by high-performance liquid chromatography-diode-array-detection,
484 *Anal. Chim. Acta* **2002**, *460*, 61-72.
- 485 (24) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2012.
- 486 (25) Commission of the European Communities. Regulation 2568/91 on the
487 characteristics of olive oil and olive residue oil and the relevant methods of
488 analysis. *Off. J. Eur. Communities* **2003**, *248*, 1-109.

- 489 (26) FAO-WHO. Codex standard for named vegetable oils. Codex Stan 210.
490 *Codex Alimentarius*, **1999**.
- 491 (27) Charrouf, Z.; Guillaume, D. Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*,
492 *Am. J. Food. Technol.* **2007**, 2, 679-683.
- 493 (28) Chimi, H.; Rahmani, M.; Cillard, J.; Cillar, P. Étude de la fraction phénolique
494 des huiles d'olives vierges et d'argan du Maroc. *Actes de l'Institut*
495 *Agronomique et Vétérinaire* **1998**, 8, 17-22.
- 496 (29) Khallouki, F.; Younos, C.; Soulimani, R. Consumption of argan oil (Morocco)
497 with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and
498 phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects.
499 *Eur. J. Cancer Prev.* **2003**, 12, 67-75.
- 500 (30) Andjelkovic, M.; Van Camp, J.; Pedra, M.; Renders, K.; Socaciu, C.; Verhé, R.
501 Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some
502 Spanish and French olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 5181-5187.
- 503 (31) Milder, I. E.; Arts, I. C.; Van de Putte, B.; Venema, D. P.; Hollman, P. C.
504 Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol,
505 pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br. J. Nutr.* **2005**, 93, 393–
506 402.
- 507 (32) Matthäus, B.; Guillaume, D.; Gharby, S.; Haddad, A.; Harhar, H.; Charrouf, Z.
508 Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chem.* 2010, 120,
509 426-432.
- 510 (33) Hilali, M.; Charrouf, Z.; Soulhi, A. E.; Hachimi, L.; Guillaume, D. Influence of
511 origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and
512 composition. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2081-2087.

- 513 (34) Harhar, H.; Gharby, S.; El Monfalouti, H.; Guillaume, D.; Charrouf, Z.
514 Influence of argan kernel roasting-time on virgin argan oil composition and
515 oxidative stability. *Plant Foods Human Nutr.* **2011**, *66*, 63-68.
- 516 (35) Reiter, E.; Jiang, Q.; Christen, S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -
517 tocopherol. *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 668-691.
- 518 (36) Wright, M. E.; Weinstein, S. J.; Lawson, K. A.; Albanes, D.; Subar, A. F.;
519 Dixon, L.; Mouw, T.; Schatzkin, A.; Leitzmann, M.F. Supplemental and dietary
520 vitamin E intakes and risk of prostate cancer in a large prospective study.
521 *Cancer Epidem. Biomark. Prev.* **2007**, *16*, 1128-1135.
- 522 (37) Frankel, E.; Meyer, A. S. The problem of using one-dimensional methods to
523 evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*
524 **2000**, *80*, 1925-1941.
- 525 (38) Samaniego, C.; Quesada, J. J.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C.;
526 López, H.; López, M. C. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and
527 their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *593*, 103–107.
- 528 (39) Espin, J. C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H. J. Characterization of the total free
529 radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-
530 diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 648-656.
- 531 (40) El Babili, F.; Bouajila, J.; Fouraste, I.; Valentin, A.; Mauret, S.; Moulis, C.
532 Chemical study, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity to
533 human breast cancer cells (MCF7) of *Argania spinosa*. *Phytomedicine* **2010**,
534 *17*, 157-160.
- 535 (41) Valavanidis, A.; Nisiotou, C.; Papageorgiou, Y.; Kremli, I.; Satravelas, N.;
536 Zinieris, N.; Zygalki, H. Comparison of the radical scavenging potential of
537 polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal

- 538 conditions and after thermal treatment. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 2358-
539 2365.
- 540 (42) Kedage, V. V.; Tilak, J. C.; Dixit, G. B.; Devasagavam, T. P.; Mhatre, M. A
541 study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera* L.).
542 *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 175-185.
- 543 (43) Fernandez-Pachon, M. S.; Villano, D.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C.
544 Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers. *J.*
545 *Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5024-5029.
- 546 (44) Bayram, B.; Esatbeyoglu, T.; Schulze, N.; Ozcelik, B.; Frank, J.; Rimbach, G.
547 Comprehensive analysis of polyphenols in 55 extra virgin olive oils by HPLC-
548 ECD and their correlation with antioxidant activities. *Plant Foods Hum. Nutr.*
549 **2012**, *67*, 326-336.
- 550
- 551

552 **Figure legends**

553

554 **Figure 1.** Graphic distribution of oils according to MFA considering individual
555 phenolics, tocopherol fractions and antioxidant activity tests.

556

557 **Figure 2.** Graphic distribution of oils according to MFA considering individual
558 phenolics and antioxidant activity tests.

559

560

561 **Table 1.** Acid value, peroxide value and K_{270} in edible vegetable virgin oils.

	Acid value (%) ^a	Peroxide index (meq O ₂ /kg) ^b	K_{270} ^c
Argan ^d			
1	0.5±0.01	10.6±1.66	0.18±0.00
2	0.6±0.04	10.7±0.87	0.17±0.04
3	0.5±0.04	4.9±0.08	0.10±0.00
4	0.4±0.02	6.9±0.95	0.16±0.00
5	0.3±0.01	5.9±0.01	0.10±0.01
6	0.3±0.01	7.0±0.96	0.19±0.02
7	0.4±0.02	7.0±0.97	0.11±0.01
8	0.4±0.02	6.8±0.87	0.14±0.01
9	0.4±0.02	11.9±0.02	0.18±0.00
10	0.2±0.00	ND ^e	0.14±0.01
11	0.6±0.01	11.6±0.25	0.14±0.01
12	0.6±0.02	11.6±0.02	0.13±0.01
Olive ^d	0.3±0.04	4.69±0.93	0.12±0.01
Soybean	0.3±0.01	ND	0.16±0.00
Wheat germ	0.7±0.00	ND	0.15±0.00
Walnut	0.6±0.03	8.8±0.97	0.11±0.00
Almond	0.2±0.02	14.7±0.97	0.16±0.01
Sesame	0.5±0.02	11.6±0.00	0.12±0.02
Avocado	0.3±0.00	15.5±0.04	0.18±0.04
Linseed	0.7±0.00	8.7±0.88	0.13±0.02

562 ^aExpressed as percentage of oleic acid. ^bExpressed as milliequivalents of active oxygen
563 per kilogram of oil. ^cExtinction coefficient calculated from absorption at 270 nm. ^dExtra
564 virgin quality category. ^eND, not detected.

565

566

Table 2. Phenolic compound content (mg kg⁻¹) in edible vegetable virgin oils.

	Argan ^a	Olive ^a	Soybean	Wheat germ	Walnut	Almond	Sesame	Avocado	Linseed
Gallic acid	0.21±0.15	0.31±0.10	0.21±0.04	0.10±0.04	0.44±0.19	0.39±0.04	0.22±0.09	ND	0.31±0.04
Hydroxytyrosol	3.73±2.47	9.20±0.54	1.50±0.01	2.06±0.17	ND	1.77±0.02	1.74±0.33	ND	ND
Dihydroxybenzoic acid	2.07±0.90	5.51±0.87	ND	ND	1.76±0.28	ND	0.77±0.01	ND	1.93±0.67
Tyrosol	2.14±1.50	21.27±0.83	ND	2.18±0.07	3.49±1.17	ND	0.93±0.01	ND	ND
Hydroxybenzoic acid	1.20±0.89	0.91±0.33	0.48±0.05	0.58±0.05	ND	ND	0.50±0.01	ND	ND
Hydroxyphenylacetic acid	5.29±3.47	3.82±0.70	ND	2.36±0.09	ND	ND	ND	2.64±0.27	ND
Vanillic acid	1.19±0.70	1.98±0.24	ND	1.57±0.33	1.25±0.01	1.25±0.01	ND	0.41±0.01	ND
Caffeic acid	1.12±0.23	1.22±0.07	0.82±0.01	1.06±0.14	0.90±0.03	ND	0.84±0.03	1.92±0.85	0.86±0.02
Syringic acid	3.05±0.93	6.55±1.13	1.76±0.01	ND	1.74±0.01	1.75±0.01	1.85±0.02	1.42±0.82	1.80±0.10
p-vanillin	2.43±1.49	6.75±2.04	0.79±0.01	0.97±0.01	ND	0.98±0.02	1.05±0.10	4.01±0.03	ND
p-coumaric acid	0.57±0.25	1.50±0.82	0.57±0.02	0.66±0.01	0.54±0.01	0.64±0.02	0.60±0.06	ND	0.54±0.01
Ferulic acid	3.43±2.98	10.45±1.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
o-coumaric acid	0.93±0.51	2.41±0.89	1.06±0.01	1.37±0.32	1.10±0.03	1.07±0.01	2.86±0.28	ND	0.53±0.01
o-vanillin	3.28±2.19	7.35±1.11	1.28±0.01	1.51±0.04	1.27±0.01	1.31±0.07	1.447±0.01	ND	ND
Oleuropein	ND ^b	32.78±2.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pinosresinol	2.70±0.47	22.40±1.37	2.51±0.05	3.09±0.06	2.48±0.03	3.08±0.06	2.82±0.57	2.00±0.90	1.22±0.01
Luteolin	ND	2.14±0.41	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Quercetin	7.74±2.25	2.51±0.55	1.25±0.19	2.08±0.14	7.19±0.62	7.80±0.20	7.41±1.08	3.03±0.53	0.52±0.01

^aExtra virgin quality category. ^bND, not detected.

Table 3. Tocopherol content (mg kg^{-1}) in edible vegetable virgin oils.

	Argan ^a	Olive ^a	Soybean	Wheat germ	Walnut	Almond	Sesame	Avocado	Linseed
α -tocopherol	48.8 \pm 11.8	169 \pm 4.19	74.3 \pm 0.14	750 \pm 0.22	45.1 \pm 1.26	481 \pm 0.05	24.4 \pm 0.01	164 \pm 2.75	29.4 \pm 2.00
β -tocopherol	8.98 \pm 2.20	2.37 \pm 0.67	23.2 \pm 0.84	168 \pm 2.13	15.2 \pm 1.13	16.6 \pm 2.20	15.1 \pm 2.31	18.4 \pm 0.16	ND
γ - tocopherol	356 \pm 24.7	19.8 \pm 5.11	328 \pm 0.31	386 \pm 1.03	333 \pm 0.19	44.4 \pm 0.01	380 \pm 0.17	26.9 \pm 0.02	294 \pm 0.07
δ - tocopherol	40.3 \pm 7.92	0.87 \pm 0.15	176 \pm 0.01	124 \pm 1.07	42.3 \pm 1.14	18.7 \pm 1.85	14.9 \pm 0.01	20.6 \pm 1.93	18.5 \pm 0.69

^aExtra virgin quality category. ^bND, not detected.

Table 4. Total antioxidant activity of edible vegetable virgin oils, determined by ABTS, DPPH, FRAP tests (mM Trolox kg⁻¹).

	Argan ^a	Olive ^a	Soybean	Wheat germ	Walnut	Almond	Sesame	Avocado	Linseed
ABTS	0.44±0.31	1.19±0.38	ND	0.19±0.01	0.01±0.00	ND	0.31±0.01	ND	0.02±0.00
DPPH	0.20±0.01	1.11±0.31	0.19±0.01	0.16±0.00	0.23±0.00	0.17±0.01	0.22±0.00	0.12±0.00	0.23±0.00
FRAP	0.13±0.06	4.31±1.49	0.17±0.01	0.88±0.01	0.50±0.00	ND	0.88±0.01	ND	0.34±0.02

^aExtra virgin quality category. ^bND, not detected.

Table 5. Pearson correlation coefficients between antioxidant activity and concentrations of phenolic compounds or tocopherol fractions in edible vegetable virgin oils.

	DPPH		ABTS		FRAP	
	r	p	r	p	r	p
Phenolic compounds						
Gallic acid	0.136	NS	-0.019	NS	0.113	NS
Hydroxytyrosol	0.681	***	0.787	***	0.636	***
Dihydroxybenzoic acid	0.695	***	0.724	***	0.633	***
Tyrosol	0.940	***	0.706	***	0.915	***
Hydroxybenzoic acid	0.091	NS	0.523	**	0.067	NS
Hydroxyphenylacetic acid	0.093	NS	0.415	*	0.037	NS
Vanillic acid	0.361	NS	0.537	**	0.354	NS
Caffeic acid	0.124	NS	0.265	NS	0.130	NS
Syringic acid	0.734	***	0.773	***	0.644	***
p-vanillin	0.615	***	0.601	***	0.572	***
p-coumaric acid	0.745	***	0.692	***	0.764	***
Ferulic acid	0.713	***	0.782	***	0.656	***
o-coumaric acid	0.413	*	0.444	*	0.496	**
o-vanillin	0.556	**	0.669	***	0.516	**
Oleuropein	0.968	***	0.698	***	0.944	***
Pinoresinol	0.965	***	0.723	***	0.945	***
Luteolin	0.886	***	0.632	***	0.856	***
Quercetin	-0.330	NS	-0.055	NS	-0.378	*
Tocopherols						
α-tocopherol	-0.010	NS	-0.135	NS	0.100	NS
β-tocopherol	-0.187	NS	-0.177	NS	-0.020	NS
γ-tocopherol	-0.534	**	-0.180	NS	-0.473	**
δ-tocopherol	-0.330	NS	-0.353	NS	-0.263	NS

* $p < 0.05$; * $p < 0.01$; * <0.001 ; NS, non-significant.

Table 6. Loadings for the different variables in Factors 1 and 2 of the MFA including phenolic compounds, tocopherol fractions and antioxidant tests^a

	Factor 1	Factor 2
Phenolic compounds		
Gallic acid	0.077	-0.181
Hydroxytyrosol	0.198	-0.222
Dihydroxybenzoic acid	0.143	-0.488
Tyrosol	0.466	-0.228
Hydroxybenzoic acid	-0.302	-0.090
Hydroxyphenylacetic acid	-0.179	-0.212
Vanillic acid	0.144	-0.107
Caffeic acid	0.043	-0.105
Syringic acid	0.283	-0.454
p-vanillin	0.418	-0.246
p-coumaric acid	0.220	-0.115
Ferulic acid	0.232	-0.323
o-coumaric acid	0.262	-0.113
o-vanillin	0.095	-0.246
Oleuropein	0.583	-0.222
Pinoresinol	0.570	-0.203
Luteolin	0.575	-0.217
Quercetin	-0.388	-0.063
Tocopherols		
α-tocopherol	0.306	0.525
β-tocopherol	-0.114	0.686
γ-tocopherol	-0.972	0.220
δ-tocopherol	-0.203	0.959
Antioxidant tests		
DPPH	0.500	-0.245
ABTS	0.109	-0.340
FRAP	0.446	-0.160

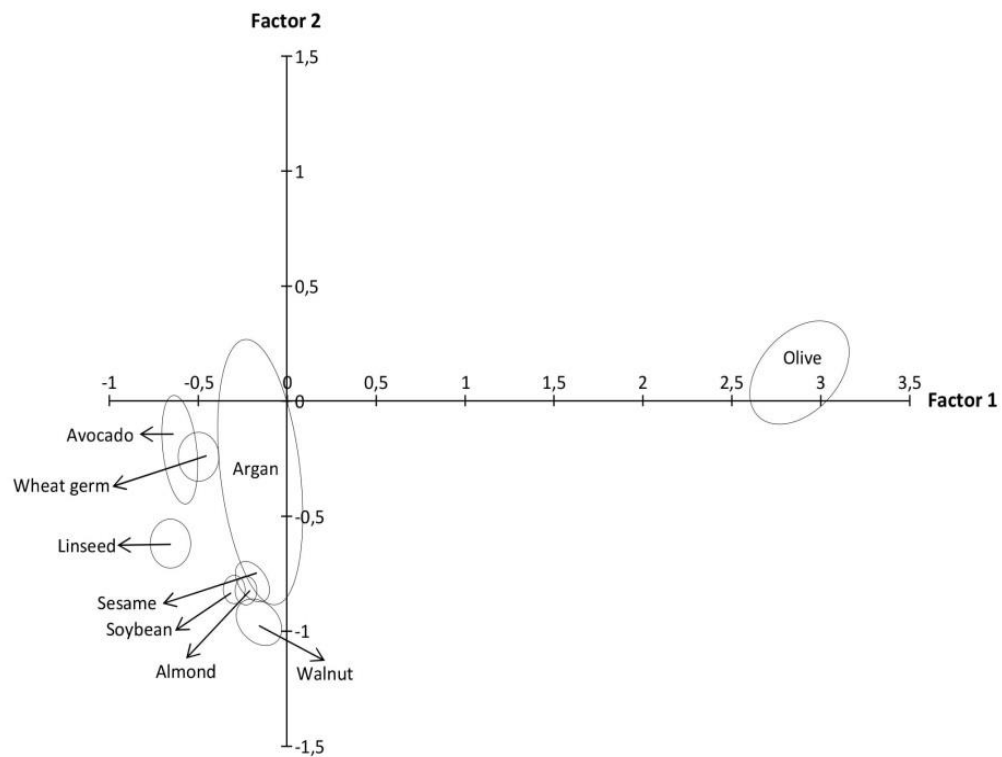
^a Values in bold represent the highest absolute values in Factor 1 and Factor 2.

Table 7. Loadings for the different variables in Factors 1 and 2 of the MFA including phenolic compounds and antioxidant tests^a

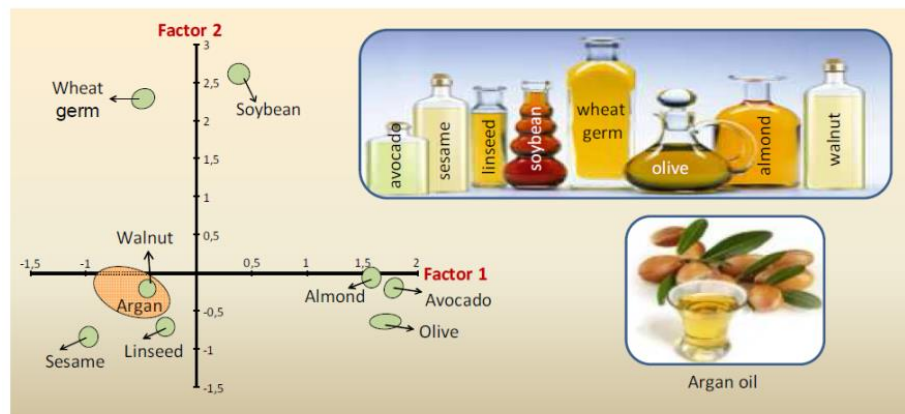
	Factor 1	Factor 2
Phenolic compounds		
Gallic acid	0.184	-0.333
Hydroxytyrosol	0.684	0.685
Dihydroxybenzoic acid	0.727	0.488
Tyrosol	0.965	0.100
Hydroxybenzoic acid	0.113	0.759
Hydroxyphenylacetic acid	0.049	0.968
Vanillic acid	0.407	0.587
Caffeic acid	0.067	0.530
Syringic acid	0.728	0.518
p-vanillin	0.593	0.526
p-coumaric acid	0.674	0.202
Ferulic acid	0.695	0.694
o-coumaric acid	0.507	0.092
o-vanillin	0.660	0.495
Oleuropein	0.983	0.066
Pinoresinol	0.985	0.066
Luteolin	0.954	0.028
Quercetin	-0.221	-0.023
Antioxidant tests		
DPPH	0.956	0.046
ABTS	0.715	0.400
FRAP	0.928	-0.005

^a Values in bold represent the highest absolute values in Factor 1 and Factor 2.

Figure 2



TOC Graphic



4. Bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos individuales del aceite de argán virgen extra utilizando UPLC-ESI-MS/MS.

Analysis of individual phenolic compounds in extra virgin argan oil before and after *in vitro* digestion by UPLC-ESI-MS/MS¹

Ascensión Rueda^a, Samuel Cantarero^b, Isabel Séiquer^c, Carmen Cabrera^a, Rafael Giménez^a, Manuel Olalla^a

^a Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Spain

^b Centro de Instrumentación Científica. Campus Universitario de Fuentenueva. Universidad de Granada, Granada, Spain

^c Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Armilla, Granada, Spain

* Corresponding author: Ascensión Rueda.

Address: Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja S/N, 18071, Granada, Spain

Phone number: +35-958243864

Fax: +34-958249577

E-mail: a.rueda.robles@gmail.com

¹ UPLC-ESI-MS/MS: Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry; MRN: multiple reaction monitoring

ABSTRACT

The bioaccessibility of individual phenolic compounds in extra virgin argan oil was evaluated using an *in vitro* digestion method, and extra virgin olive oil and virgin soybean oil were used to compare the results obtained. The analyses were carried out by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring. Before the digestion process, eleven compounds were identified in the argan oil, ten in the soybean oil and twelve in the olive oil. The quantities of polyphenols found in argan oil before the digestion process were in general higher than those found in soybean and olive oil, but in soybean oil some compounds which were not identified in the chemical extract were detected after digestion. After the digestion process, a general decrease in the concentrations (losses of 80-100% of the initial content) of most of the polyphenols analysed took place, but some such as caffeic acid and o-coumaric acid became detectable after digestion in argan oil and soybean oil respectively. The results obtained indicate that only a minor fraction of polyphenols may be considered bioavailable, probably due to the transformations that take place under intestinal conditions.

Keywords: Individual polyphenols, argan oil, UPLC, *in vitro* digestion

Chemical compounds studied in this article:

Tyrosol (PubChem CID: 10393); p-Coumaric acid (PubChem CID: 637542); Ferulic acid (PubChem CID: 445858); 4-Hydroxyphenylacetic acid (PubChem CID: 127); Quercetin (PubChem CID: 5280805); Vanillin (PubChem CID: 1183); Gallic acid (PubChem CID: 370); Vanillic acid (PubChem CID: 8468); Caffeic acid (PubChem CID: 689043); Syringic acid (PubChem CID: 10742).

1. Introduction

Virgin argan oil is a product obtained from roasted seeds of the fruit of the argan tree *Argania spinosa L. Skeels*, which is endemic to SW Morocco. This oil has been used by the Berber population for centuries due to its sensorial and health-giving properties (Ahansal et al., 2008).

Virgin argan oil is characterised by an elevated content of linoleic and oleic acids; moreover, it is rich in polyphenols, tocopherols, squalene, sterols, carotenoids, CoQ₁₀, melatonin and other minor constituents (Cabrera et al., 2012; Venegas et al., 2011; Rueda et al., 2014). This special composition may explain its beneficial effects on human health; it helps prevent cardiovascular diseases due to its antioxidant potential, and has an antiproliferative effect on several cancers (Vauzour et al., 2010). The presence of phenols and phytosterols in argan oil has been associated with a cholesterol-lowering activity (Guillaume & Charrouf, 2011) and antidiabetic effects have been shown in rats (Bellahcen et al., 2012). Therefore, virgin argan oil is considered a potential functional food (Cabrera-Vique et al., 2012).

Among the bioactive compounds present in virgin argan oil, polyphenols play an important role, since their antioxidant activity is related to cardioprotective (Pandey & Rizvi, 2009) and anti-inflammatory effects (Rosillo et al., 2014). Polyphenols such as caffeic acid, oleuropein, vanillic acid, tyrosol, ferulic acid, syringic acid, p-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, catechol, resorcinol and 4-hydroxybenzyl have been identified in virgin argan oil (Charrouf & Dominique, 2007, 2008), but its bioaccessibility has not yet been evaluated. The concept of bioaccessibility refers to the fraction of a compound which is released from the food matrix in the gastrointestinal tract and becomes available for absorption (Heaney, 2001). The polyphenol's beneficial effects can only be truly effective if they reach the relevant tissues and exert their action at a sufficient concentration to have a biological effect.

Techniques such as gas chromatography, capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC) have been applied to determine polyphenol content (Kartsova & Alekseeva, 2007). The use of ultra-performance liquid chromatography (UPLC) decreases the time needed for analysis (<20 minutes), improves the resolution and provides great sensitivity, and this method, coupled with a MS/MS technique makes it easy to detect a large number of compounds in a short time (Alarcón Flores et al., 2012). This is achieved by increasing the signal/noise ratio,

which leads to narrower peaks with better resolution (Suárez et al., 2008). This technique has been used to analyse various types of foods and to identify compounds of interest (Alarcón-Flores et al., 2012; Klimczak & Gliszczynska-Swiglo, 2015).

The samples were pre-treated to obtain a suitable matrix and to pre-concentrate the polyphenols. The bioaccessibility of individual phenolic compounds in extra virgin argan oil, extra virgin olive oil and virgin soybean oil was evaluated by an *in vitro* digestion method simulating the human gastrointestinal digestion process. Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) in MRM was used as an analytical technique. The high sensitivity of this method enabled us to obtain low detection limits. Coupling mass spectrometry to liquid chromatography, through ESI (a technique applied to produce ions using an electrospray in which a high voltage is applied to a liquid to create an aerosol), is an effective system in the analysis of polar, labile and/or low molecular weight compounds (Borras-Linares, 2013).

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

All chemicals were analytical reagent grade or higher purity. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA). Methanol and acetonitrile were supplied by Sigma-Aldrich (LC-MS Ultra CHROMASOLV® Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Sodium bicarbonate, sodium carbonate and hydrochloric acid (37%) were purchased from Merck (Merck, Darmstadt, Germany).

The commercial phenolic compound standards used were oleuropein, p-coumaric acid, o-coumaric acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, quercetin, vanillin, gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid and syringic acid, all purchased from Sigma-Aldrich. Ferulic acid, tyrosol, luteolin and vanillic acid were purchased from Fluka Chemicals (Madrid, Spain). Stock standard solutions were prepared by dissolving each phenolic compound at a concentration of 10 mg/mL in methanol, and the resulting solution was then stored at -18 °C.

2.2 Samples

Four different commercial samples of extra virgin argan oil, obtained from specialist stores in Spain, were included in the study. The samples were produced in Morocco and obtained by cold pressing. In addition, four samples of Spanish extra virgin olive oil (Picual variety, the variety most commonly found in Spain and which has a high polyphenol content) and four samples of virgin soybean oil were acquired in local stores. The oil samples were carefully handled to avoid contamination and correctly stored and maintained at a temperature of 4 °C until analysis.

2.3 *In vitro* digestion

The *in vitro* digestion procedure was performed according to the method described by Laparra et al. (2008), slightly modified. The method consists of two sequential steps; an initial pepsin/HCl digestion to simulate gastric conditions, followed by a digestion with bile salts/pancreatin to simulate duodenal digestion. Four grams of oil samples were mixed with 9 mL of bidistilled deionised water and sonicated (Vibracell VCX 130, Sonics & Materials INC, Danbury, Connecticut, USA). The pH was adjusted to 2 using HCl 1N. Pepsin (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) was added to a final concentration of 0.05 g of pepsin / g sample and the samples were incubated in a shaking water bath (Bunsen, Madrid, Spain) at 110 oscillations/min, at 37 °C for 2 hours. For intestinal digestion, the pH was raised to 6 with NaHCO₃ (1 M) dropwise, and 2.5 ml of a mixture of 0.4g of pancreatin + 0.25 g of bile salts (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) were added. The final pH was adjusted to 7 with NaHCO₃ (1 M) and the samples were incubated in a shaking water bath (110 rpm; 37 °C) for 2 hours. After gastrointestinal digestion, the digestive enzymes were inactivated by heat treatment for 4 min at 100 °C in a polyethylenglycol bath. The samples were then cooled by immersion in an ice bath and centrifuged at 10,000 rpm (Sorvall RC 6 Plus centrifuge, Thermo Scientific, Madrid, Spain) for 30 min at 4 °C. The supernatants were carefully separated to obtain the bioavailable fraction, which was filtered using Vivaspin® 2 ml Centrifugal Concentrator to remove the potential presence of protein, and then freeze-dried and stored at 4 °C for chromatographic analysis. Throughout the process, the samples were protected from light, cooled with an ice bath and submitted to sonication before each step.

2.4 Phenolic extract

A liquid–liquid extraction adaptation technique (Montedoro et al., 1992) was used to determine individual phenolic compounds; 15 g of oil was mixed with 10 ml of methanol 80% v/v. The mixture was shaken in an orbital shaker (SSL1, Fisher Scientific, Madrid, Spain) for 1 hour and centrifuged (Hettichzentrifugen Universal 320, England) at 8000 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed and the process was repeated twice. Using a rotary evaporator (R-215, Buchi Switzerland), we obtained a gelatinous residue which was dissolved in 5 ml of methanol and filtered through a 0.45 µm Millipore syringe filter.

2.5 UPLC analysis of polyphenols

Analyses of polyphenols were carried out in chemical extracts and in bioavailable fractions obtained after the *in vitro* digestion of oils.

Chromatographic analysis of the polyphenols was performed in the Scientific Instrumentation Centre of the University of Granada using an Acquity UPLC H-Class with MS detection (Waters, Barcelona, Spain) and separations were achieved using an Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm x 2.1 mm, 1.8µm particle size). Chromatographic separation was carried out using a gradient elution with water + 0.5 % acetic acid as eluent A and acetonitrile +0.5 % acetic acid as eluent B. The flow rate was 650µL/min, the column was maintained at 45 °C and the injection volume was 10 µL. Gradient conditions were as follows: initial mobile phase, 99% (A), which was linearly decreased to 70% (A) within 10.0 min and to 5% within 12.0 min. Finally, it was returned to 99% in 0.1 min and maintained for 2.9 min to equilibrate the column. Total run time was 15 min.

Mass spectrometry analysis was carried out using a Waters XEVO TQ-S tandem quadrupole mass spectrometer. The instrument was operated using ESI ionisation in negative ion mode. Data acquisition was performed using MassLynx 4.1 software with the QuanLynx program (Waters). For MS/MS detection, the ionisation source parameters in negative mode were the following: capillary voltage 2.00 kV and cone voltage 10 V; the source temperature was 100 °C and the desolvation temperature, 300 °C. The cone gas (nitrogen) and desolvation gas (also nitrogen) were set at flow rates of 150 and 500 L/h, respectively.

The conditions used were adapted from previous papers (Goh & Gledhill, 2011), seeking to obtain high sensitivity and to reduce analysis time. IntelliStart™ Software

was used to develop MRM acquisition methods for the 14 phenolic compounds targeted in this analysis. Standard solutions of 10 mg/L of each phenolic compound at a flow rate of 10 μ L/min were infused at first and then combined with the mobile phase flow. The collision voltage was optimised, selecting the most sensitive transition for quantification. Although some phenolic compounds presented the same retention time, they could be identified because they had different quantification and confirmation transitions. Quantification of the samples was performed against a calibration curve for each of the polyphenol analytes in solution.

2.6 Analytic validation of the method

Table 1 shows the parameters optimised for quantification using MRM, the calibration curves obtained, the recovery percentages and the limits of detection and of quantification (LOD and LOQ, respectively) obtained for each compound. After optimising the transitions, calibration curves were constructed for each compound, using various concentration ranges, but always including at least 5 different concentration points. LOD was determined by using a signal-to-noise ratio of 3, and LOQ, by using a signal-to-noise ratio of 10. **Figure 1** shows a representative chromatogram obtained from the standard mixture of the 14 compounds selected for analysis.

The R² values were greater than 0.9901 for all the compounds used, and the detection limits ranged from 0.07 μ g/kg for hydroxyphenylacetic acid to 0.26 μ g/kg for quercetin. The recovery (%) was calculated as the percentage from the known amount of standard added to a refined vegetable oil. Analyses were carried out in triplicate.

2.7 Statistical analysis

Statgraphics v5.1 statistical software was used for the statistical analyses. The results are expressed as mean values \pm standard error (SE). The normal distribution of the results was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test. The homogeneity of variance of the samples was confirmed by Bartlett's test, and analysis of the variance was performed to determine the significant differences between the different types of oils. A level of P<0.05 was considered significant in all tests. Multivariate discriminant analysis was performed to study, from a statistical standpoint, the relationship between the oils according to the polyphenol content determined in the chemical extracts. This analysis establishes discriminant functions that can help predict the type of oil according to the values of all the phenols represented in the independent variables.

3. Results and discussion

3.1 Polyphenol levels in oils before the digestion process

Table 2 shows the results for the 3 oils tested. Of the 14 phenolic compounds analysed, 11 were detected in argan oil, 10 in soybean oil, and 12 in olive oil.

The most significant of these compounds quantified for argan oil were hydroxyphenylacetic acid, ferulic acid, vanillin and 3,4-dihydroxybenzoic acid. This conflicts with the findings of Chimi et al. (1988), who reported that caffeic acid and oleuropein were the only phenolic compounds present. Although we did not detect these two compounds in the chemical extract of the oil analysed, other studies have reported their presence, albeit at low concentrations (Charrouf & Guillaume, 2008). Other compounds that have been quantified in argan oil are vanillic acid and tyrosol; these polyphenols were identified as major components of argan oil by Charrouf & Guillaume (2007). Khallouki et al. (2003) measured the following quantities in commercial argan oil: vanillic acid 123 µg/kg; syringic acid (68 µg/kg), tyrosol 52 µg/kg. These levels are lower than those obtained in our study, although the concentration of ferulic acid is slightly higher (3470 µg/kg). Aidoud et al. (2014) also measured lower quantities than those found in our study, with respect to vanillic acid (67 µg/kg), syringic acid (37 µg/kg) and tyrosol (12 µg/kg), together with a higher level of ferulic acid (3147 µg/kg).

Some polyphenols have been identified in the leaves and the fruit pulp of the argan tree (Charrouf & Guillaume, 2007; Joguet & Maugard, 2013). In the press cake, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid and vanillin have been identified (Rojas et al., 2005). Our own analysis quantified significant amounts of 3,4-dihydroxybenzoic acid, which inhibits the oxidation of LDL-cholesterol, has neuroprotective and antioxidant properties and prevents carcinogenesis (Kakkar & Bais, 2014).

In soybean oil, the two polyphenols for which the highest concentrations were identified were gallic acid and tyrosol, but in neither case did these exceed the concentrations found in argan oil. Significant amounts of vanillic acid, p-coumaric acid and ferulic acid were also found, slightly higher quantities than those encountered by Siger et al. (2007). Significant amounts of luteolin, in quantities similar to those found for argan oil, were also observed. This substance presents significant anti-inflammatory activity, is widely used in traditional Chinese medicine and may have anticancer properties (Lin et al., 2008). It is not usually found in soybean oil. O-coumaric acid, quercetin, oleuropein

and caffeic acid were not detected. In soybean oil, most of the phenolic compounds detected may be bound to other compounds and not detectable until acid hydrolysis takes place, as occurs in conditions of acidic digestion.

The phenolic content of olive oil is influenced by the type of olive, the geographic and environmental conditions, the degree of maturation and the extraction process applied to the fruit (Alarcón-Flores et al., 2012). Our sample contained significant quantities of tyrosol, hydroxyphenylacetic acid, luteolin and ferulic acid, in contrast to the findings of Alarcón-Flores et al. (2012), who did not detect gallic acid or tyrosol in the same type of oil (obtained from the Picual variety of olives). The results of previous research in this field, with respect to tyrosol, vary widely, ranging from the 4.69 mg/kg reported by Coni et al. (2000) to the 27.5 mg/kg measured by Owen et al. (2000). According to Tuck et al. (2002), the main phenolic compounds in olive oil are tyrosol, p-coumaric acid and oleuropein. However, we only found oleuropein in the olive oil samples, in quantities similar to those reported by Coni et al. (2000). Greater quantities of tyrosol, vanillic acid, 3,4-dihydroxybenzoic, p-coumaric acid, ferulic acid and luteolin were measured in olive oil than in argan oil.

Statistical analysis, for a confidence level of 95%, indicated statistically significant differences between the oils tested ($p < 0.05$), except for luteolin ($p = 0.403959$).

Table 3 shows the eigenvalues and discriminant functions obtained. With this analysis, using the phenols analysed as variables, we obtained 100% in the classification of the three types of oils. Each function was defined by different coefficients; the most important variables for discriminating argan oil were found to be vanillin, p-coumaric acid, ferulic acid and oleuropein, while those for olive oil were dihydroxybenzoic acid, hydroxyphenylacetic acid, vanillin, p-coumaric acid, ferulic acid and oleuropein. For soybean oil, the main variable was oleuropein.

The results of the discriminant analysis are shown in **Figure 2** which thus provides a two-dimensional representation of the similarity between types of oil, according to the first two discriminant functions. To avoid any overlapping of the derivatives, we used the average value of the discriminant function, i.e., the centroid, for each of the oils. Thus, a clear separation between oils may be observed, according with the different phenolic composition in the initial chemical extracts.

3.2 Polyphenol levels in oils after the digestion process

The simulation of digestion is widely used in many fields of food and nutritional science, as human trials are often expensive, require considerable resources and may be ethically questionable (Minekus et al., 2014). *In vitro* models of digestion provide a useful alternative to animal and human models and the results supplied are fast and accurate (Hura et al., 2011).

In our study, polyphenol concentrations decreased during the simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. This could be due to the effect of the digestion process itself and to the changes in pH, which reduce the presence of the compounds, or because of a change in their structure (Wong et al., 2014). **Table 2** shows the results obtained, notable among which is the decreased concentration of most of the polyphenols. However, some compounds became detectable or their concentration increased slightly, as was the case of 3,4-dihydroxybenzoic acid, ferulic acid, gallic acid, vanillic acid, vanillin and p-coumaric acid in soybean oil, of caffeic acid in argan oil and olive oil, and of gallic acid and o-coumaric acid in olive oil. It has been suggested that after an *in vitro* digestion process caffeic acid concentrations tend to increase, although not significantly (Miranda et al., 2013). We observed major decreases in the presence of compounds that could have been transformed into others, i.e., syringic acid 92.7% (argan oil) and 94.6% (olive oil); 3,4-dihydroxybenzoic acid 94.8% (argan) and 100% (olive oil); tyrosol 91.1% (argan oil), 97.7% (olive oil) and 100% (soybean oil); hydroxyphenylacetic acid 98.1% (argan oil) and 94.3% (olive oil); vanillin 95.1% (argan oil) and 80.5% (olive oil); ferulic acid 93.7% (argan oil) and 100% (olive oil); luteolin 100% for all oils. These losses or changes were greater than those reported by Wong et al. (2014), and by other studies which have indicated that the process of digestion reduces phenolic content by 47-62% (Bouayed et al., 2011).

Few previous studies have sought to determine the concentration of polyphenols after *in vitro* digestion in argan or soy oil. **Figure 3** shows a chromatogram of a sample of argan oil. The highest levels of polyphenols found in this oil were of vanillic acid, p-coumaric acid and o-coumaric acid; in soybean oil, the highest concentrations were of vanillin, gallic acid and ferulic acid, in quantities greater than those found in the oil initially, which might be influenced by the digestion process itself.

The bioaccessible fraction of argan oil contained greater quantities of 3,4-dihydroxybenzoic acid, tyrosol, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, o-coumaric acid and ferulic acid than did the soybean and olive oils. The increased concentrations of phenolic compounds in soybean oil may be because the digestion

process helps release the polyphenols that are bound to other compounds. Nevertheless, there is still insufficient understanding of polyphenol content in virgin soybean oil.

Figure 4 shows the percentage of bioavailability of different polyphenols to argan, olive and soybean oils after the digestion process, in relation to the initial concentration observed in the chemical extracts. Caffeic acid was found to be present in olive and argan oil after the digestion, but not before. In general, the losses or changes that took place in olive oil after the digestion process were somewhat greater than those for argan oil. Digestion produced a large loss or transformation in concentrations of tyrosol in olive oil, which may be due to the process of incubation with bile salts and pancreatin (Soler et al., 2010).

Our statistical analysis revealed significant differences ($p < 0.05$) for all the phenolic compounds analysed.

4. Conclusions

The concentrations of polyphenols found in argan oil were higher than those in olive oil and soybean oil, and those in olive oil were higher than in argan oil and soybean oil for tyrosol, vanillin acid, ferulic acid, p-coumaric acid and luteolin.

In this study, the similarities and differences between argan oil and other edible vegetable oils, as regards the chemical extract, and according to the profile of each phenolic species, were established by the multivariate method.

In general, the bioavailable fraction of polyphenols in the gastric-intestinal environment was lower than in the initial content of the oil, although in the case of soybean oil this value rose slightly. This may occur because during digestion the concentration of polyphenols decreases or increases as they are freed from attachments to other substances, or they may be affected by the pH conditions of the digestive process. In any case, to better understand the transformation of polyphenols during the digestion process more extensive study will be required, to determine the presence of new metabolites.

The quantities of polyphenols measured in the bioavailable fraction demonstrate that some are capable of withstanding the conditions of the digestion process and of becoming available, albeit at a lesser concentration, for subsequent uptake by the cells.

Highlights

1. The UPLC-ESI-MS/MS method of polyphenol analysis was applied.
2. Extra virgin argan oil contained polyphenols after the simulated digestion process.
3. 11 compounds were quantified in argan oil before and after digestion
4. Two edible vegetable oils were used to compare the results obtained.

Figure legends

Fig. 1. UPLC–MS/MS chromatograms obtained from polyphenol reference standards.

Fig. 2. Similarity of the oils according to the first two discriminating functions of the discriminant analysis.

Fig. 3. UPLC–MS/MS chromatograms obtained from the digested argan oil sample.

Fig. 4. Bioavailability of different polyphenols in argan oil, olive oil and soybean oil after the digestion process.

5. References

- Ahansal, L., Ben Sassi, A., Martini, A., Vaughan-Martini, A., Walker G & Boussaid, A. (2008). Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) in Morocco. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 777-782.
- Aidoud, A., Ammouche, A., Garrido, M., & Rodriguez, A. B. (2014). Effect of lycopene-enriched olive and argan oils upon lipid serum parameters in Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2943-2950.
- Alarcon-Flores, M. I., Romero-Gonzalez, R., Frenich, A. G., & Martinez Vidal, J. L. (2012). Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 134, 2465–2472.
- Bellahcen, S., Mekhfi, H., Ziyat, A., Legssyer, A., Hakkou, A., Aziz, M., & Bnouham, M. (2012). Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. *Phytotherapy Research*, 26, 180-5.

- Borras-Linares, M. I (2013). Uso de técnicas separativas acoplada a espectrometría de masas de alta resolución para estudios metabolómicos de nutraceuticos y matrices vegetales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Bouayed, J., Deußler, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131, 1466–1472.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14–21
- Cabrera-Vique, C., Marfil, R., Giménez, R., & Martínez-Augustin, O. (2012). Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil – an edible oil with potential as a functional food. *Nutrition Reviews*, 70, 266–279.
- Charrouf, Z., & Guillaume, D. (2007). Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*, *American Journal of Food and Technology*, 2, 679-683.
- Charrouf, Z., & Guillaume, D. (2008). Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 632–636.
- Charrouf, Z., Hilali, M., Jauregui, O., Soufiaoui, M., & Guillaume, D. (2007). Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionisation tandem mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 100, 1398–1401.
- Chimi, H., Rahmani, M., Cillard, J., & Cillar, P. (1998). Étude de la fraction phénolique des huiles d'olives vierges et d'argan du Maroc. *Actes de l'Institut Agronomique et Vétérinaire*, 8, 17-22.
- Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Attei, R., & Carlini, E. A. (2000). Protective effect of Oleuropein, and olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits, *Lipids*, 35, 45–54.
- El Monfalouti, H., Charrouf, Z., Belviso, S., Ghirardello, D, Scursatone, B., Guillaume, D., Denhez, C., & Zeppa, G. (2012). Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 446–452.

- Goh, E., & Gledhill, A. (2011). Analysis of polyphenols in fruit juices using ACQUITY UPLC H-Class with UV and MS Detection. *Waters Pacific, Singapore, Waters Corporation, Manchester, UK.*
- Guillaume, D., & Charrouf, Z. (2011). Argan Oil. *Alternative Medicine Review*, 16, Number 3,
- Heaney, R. P. (2001). Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *Journal of Nutrition*, 131, 1344–8.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173, 501–513.
- Hura, S. J., Limb, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1–12.
- Joguet, N., & Maugard, T. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds of *Argania spinosa* leaves by HPLC-PDA-ESI-MS analyses and their antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 1069-1071.
- Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *Pharmacology*, DOI:10.1155/2014/952943.
- Kartsova, L. A., & Alekseeva, A. V. (2008). Chromatographic and electrophoretic methods for determining polyphenol compounds. *Journal of Analytical Chemistry*, 63, 1024–1033.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Owen, R. W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention*, 12:67–75.
- Klimczak, I., Gliszczynska-Swiglo, A. (2015). Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chemistry*, 175:100-105.
- Laparra,, J. M., Glahn, R. P., & Miller, D. D. (2008). Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and iron (Fe) availability to Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10999–11005.

- Lin, H. H., Chen, J. H., Huang, C. C., & Wang, C. J. (2007). Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *International Journal of Cancer*, 120, 2306–2316.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8, 634-46.
- Minekus, M., Almingier, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-24.
- Miranda, L., Deußler, H., & Evers, D. (2013). The impact of in vitro digestion on bioaccessibility of polyphenols from potatoes and sweet potatoes and their influence on iron absorption by human intestinal cells. *Food & Function*, 4, 1595-601.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., & Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1571-1576.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., & Bartsch H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36, 1235–1247.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-8.
- Rojas, L. B., Quideau, S., Pardon, P., & Charrouf, Z. (2005). Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argan oil and press cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9122-9127.
- Rosillo, M. Á., Alcaraz, M. J., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández-Bolaños, J. G., Alarcón-de-la-Lastra, C., & Ferrándiz, M. L. (2014). Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *The Journal of Nutrition and Biochemistry*, 25, 1275-81.

- Rueda, A., Seiquer, I., Olalla, M., Giménez, R., Lara, L., & Cabrera-Vique, C. (2014). Characterization of fatty acid profile of argan oil and other edible vegetable oils by gas chromatography and discriminant analysis. *Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/843908>
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., & Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15, 137–149.
- Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636–644.
- Soler, A., Romero, M. P., Macià, A., Saha, S., Furniss, C. S. M., Kroon, P. A., & Motilva, M. J. (2010). Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chemistry*, 119, 703–714.
- Suárez, M., Macià, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2008). Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1214, 90–99.
- Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636–644.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spence, J. P. E. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2, 1106–1131.
- Venegas, C., Cabrera-Vique, C., García-Corzo, L., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., & López, L. C. (2011). Determination of coenzyme Q10, coenzyme Q9, and melatonin contents in virgin argan oils: comparison with other edible vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12102-8.

Table 1.

Retention time windows (RTWs), MS/MS parameters of the selected phenolic compounds and analytical parameters for the UPLC method

Phenolic compound	RTW (min)	Cone voltage (V)	Transition	Collision energy (eV)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recovery (%)	Calibration curves
Gallic acid	1.0-2.5	22.0	168.93 > 125.03	14.0	0.14	0.47	96.5	Y=510255X-43456.9
3, 4-Dihydroxybenzoic acid	2.5-5.0	30.0	152.93 > 53.08	24.0	0.09	0.31	99.0	Y=11961.3X-819.205
Tyrosol	3.5-6.0	30.0	136.91 > 106.15	18.0	0.09	0.31	97.8	Y=2156.5X-157.84
Hydroxyphenylacetic acid	4.0-6.2	30.0	150.95 > 79.09	18.0	0.07	0.24	96.4	Y=149507X-11517
Vanillic acid	4.5-6.0	26.0	166.95 > 91.03	18.0	0.10	0.34	99.2	Y=30266.7X-2551.55
Caffeic acid	4.7-6.2	10.0	178.95 > 135.05	14.0	0.07	0.22	98.3	Y=792138X-57835.7
Syringic acid	4.9-6.7	12.0	197.08 > 167.03	18.0	0.05	0.17	96.6	y=105523X-7423.28
Vanillin	5.0-7.5	18.0	150.89 > 92.06	20.0	0.07	0.25	97.7	Y=68054.1X-5533.4
p-Coumaric acid	5.5-8.0	18.0	162.95 > 119.06	28.0	0.11	0.39	98.4	Y=31614.3X-3039.84
Ferulic acid	6.3-8.0	8.0	193.03 > 106.04	22.0	0.08	0.26	98.0	Y=2830.29X-317.702
o-Coumaric acid	5.5-8.0	28.0	162.95 > 93.06	24.0	0.11	0.39	97.0	Y=31681.8X-3026.2
Oleuropein	8.5-10.0	2.0	539.34 > 275.16	22.0	0.02	0.08	99.8	y=4460.53x-99.2215
Luteolin	9.0-11.3	74.0	285.08 > 133.01	38.0	0.09	0.31	98.5	y=844.103X – 88.224
Quercetin	9.0-11.3	2.0	301.14 > 151.01	24.0	0.26	0.86	98.3	y=30.596x – 7.474

Table 2.Polyphenol concentration before and after *in vitro* digestion of the different oils

Phenolic compound (µg/kg)	Samples before digestion (mean±SE)		Samples after digestion (mean±SE)	
Gallic acid	Argan	252±9.27 ^b	Argan	109±8.73 ^a
	Olive	28.6±0.44 ^a	Olive	62.0±0.42 ^b
	Soybean	106±52.9 ^a	Soybean	117±3.67 ^a
Dihydroxybenzoic acid	Argan	2247±210 ^a	Argan	127±18.8 ^a
	Olive	1904±331 ^a	Olive	-
	Soybean	13.4±5.68 ^b	Soybean	80.7±3.29 ^a
Tyrosol	Argan	2048±37.7 ^a	Argan	181±12.9 ^a
	Olive	5025±1468 ^a	Olive	112±2.98 ^b
	Soybean	43.2±5.84 ^b	Soybean	-
Hydroxyphenylacetic acid	Argan	4245±280 ^a	Argan	80.7±4.54 ^a
	Olive	1441±283 ^b	Olive	82.2±1.02 ^a
	Soybean	14.5±6.15 ^c	Soybean	-
Vanillic acid	Argan	1190±73.2 ^a	Argan	328±63.3 ^a
	Olive	1428±300 ^a	Olive	64.4±0.69 ^b
	Soybean	14.5±5.96 ^b	Soybean	-
Caffeic acid	Argan	-	Argan	90.2±6.42 ^a
	Olive	-	Olive	51.8±0.88 ^b
	Soybean	-	Soybean	-
Syringic acid	Argan	1658±189 ^a	Argan	110±16.2 ^b
	Olive	972±70.3 ^b	Olive	52.7±0.34 ^a
	Soybean	23.5±0.71 ^c	Soybean	65.1±5.42 ^{ab}
Vanillin	Argan	2429±91.6 ^a	Argan	117±12.5 ^b
	Olive	347±68.9 ^b	Olive	67.7±1.80 ^a
	Soybean	20.7±1.74 ^b	Soybean	167±23.1 ^{ab}
p-coumaric acid	Argan	334±30.2 ^a	Argan	280±51.0 ^a
	Olive	1488±54.5 ^b	Olive	66.9±2.40 ^b
	Soybean	44.9±12.7 ^c	Soybean	83.7±23.9 ^b
Ferulic acid	Argan	2478±694 ^a	Argan	156±6.97 ^a
	Olive	7055±644 ^b	Olive	-
	Soybean	18.9±8.11 ^a	Soybean	128±7.25 ^b
o-coumaric acid	Argan	526±147 ^a	Argan	227±36.8 ^a
	Olive	35.8±1.09 ^a	Olive	70.5±0.21 ^b
	Soybean	-	Soybean	106±11.9 ^a
Oleuropein	Argan	-	Argan	-
	Olive	143±66.7	Olive	-
	Soybean	-	Soybean	-
Luteolin	Argan	10.5±2.27 ^a	Argan	-
	Olive	2852±1092 ^a	Olive	-
	Soybean	18.9±8.06 ^a	Soybean	-

^{a,b,c} Different superscripts indicate significant differences between oils

Table 3.

Coefficients of the classification function for “type” and statistical values of the discriminant functions

Compounds	Argan oil	Olive oil	Soybean oil
Gallic acid	0.071	0.035	0.022
Dihydroxybenzoic acid	0.073	0.256	0.003
Tyrosol	0.011	0.055	7.640×10^{-04}
Hydroxyphenylacetic acid	0.020	0.112	0.001
Vanillic acid	-0.188	-1.075	-0.012
Syringic acid	-0.012	-0.197	-1.757×10^{-04}
Vanillin	0.286	0.732	0.011
p-Coumaric acid	0.571	2.555	0.035
Ferulic acid	0.143	1.056	0.009
o-Coumaric acid	-0.748	-5.314	-0.050
Oleuropein	2.242	19.34	0.167
Luteolin	-0.091	-0.828	-0.007
CONSTANT	-440.7	-5378	-3.118
Discriminant function	Eigenvalue	Relative percentage	Canonical correlation
1	2020	94.3	0.999
2	120.6	5.64	0.995

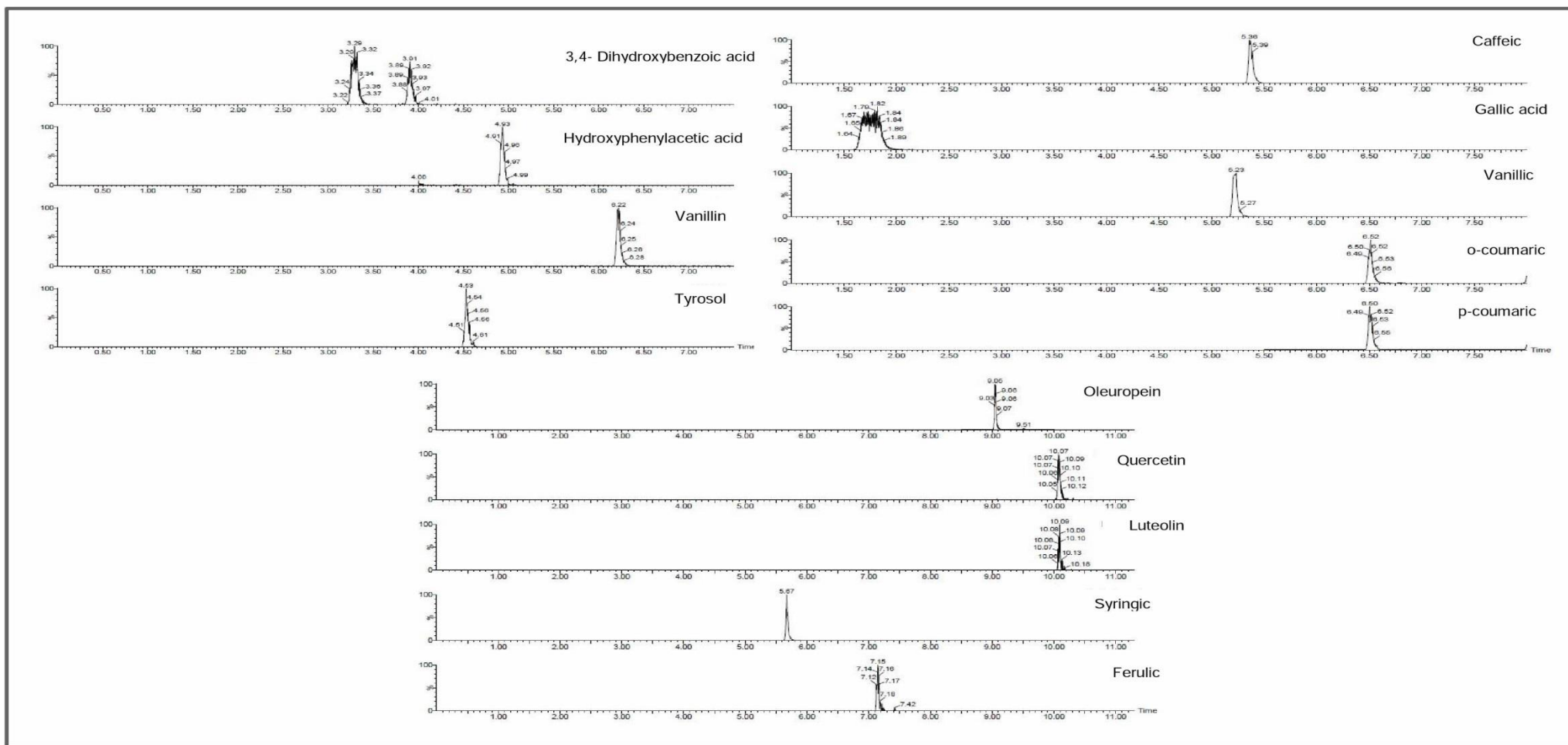


Fig. 1. UPLC-MS/MS chromatograms obtained from polyphenol reference standards.

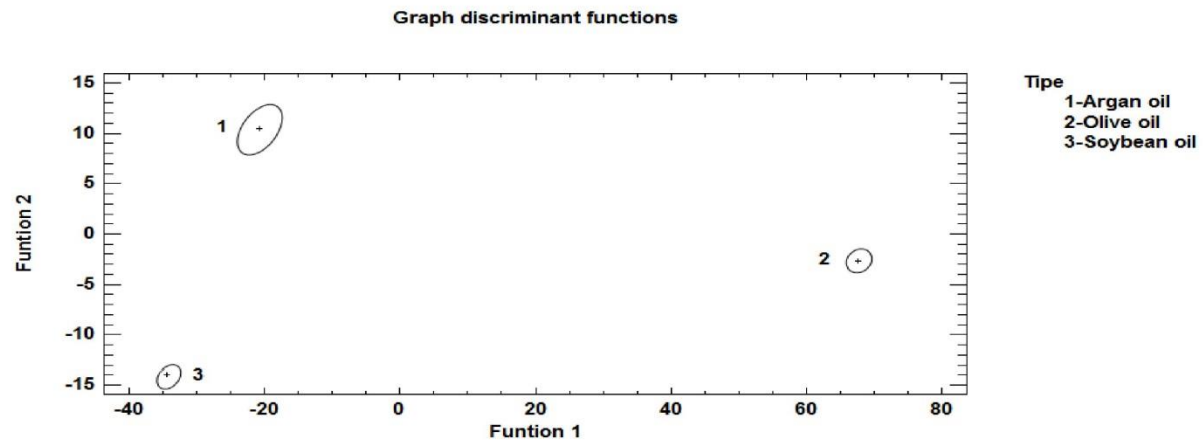


Fig. 2. Similarity of the oils according to the first two discriminating functions of the discriminant analysis.

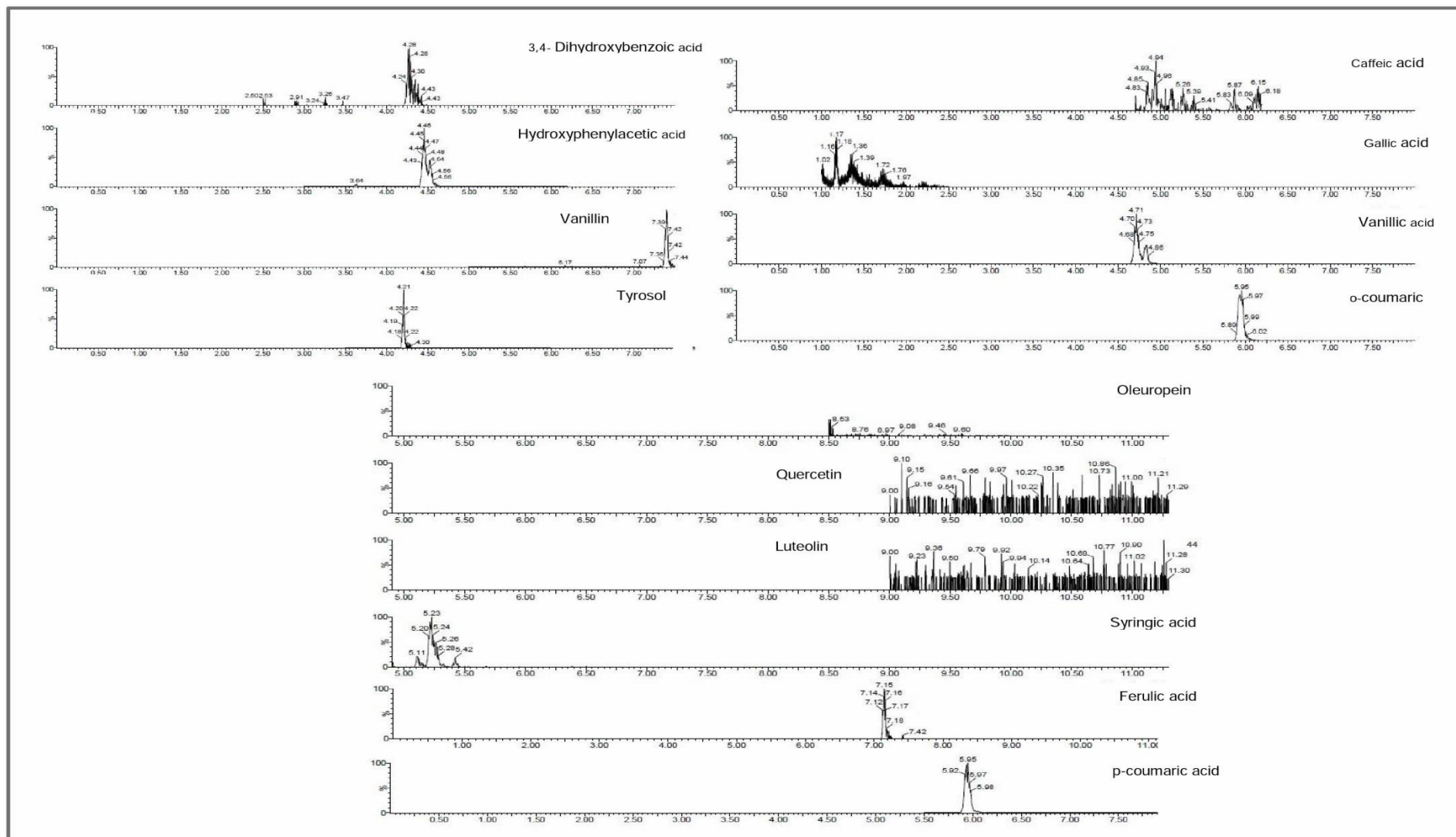


Fig. 3. UPLC-MS/MS chromatograms obtained from the digested argan oil sample

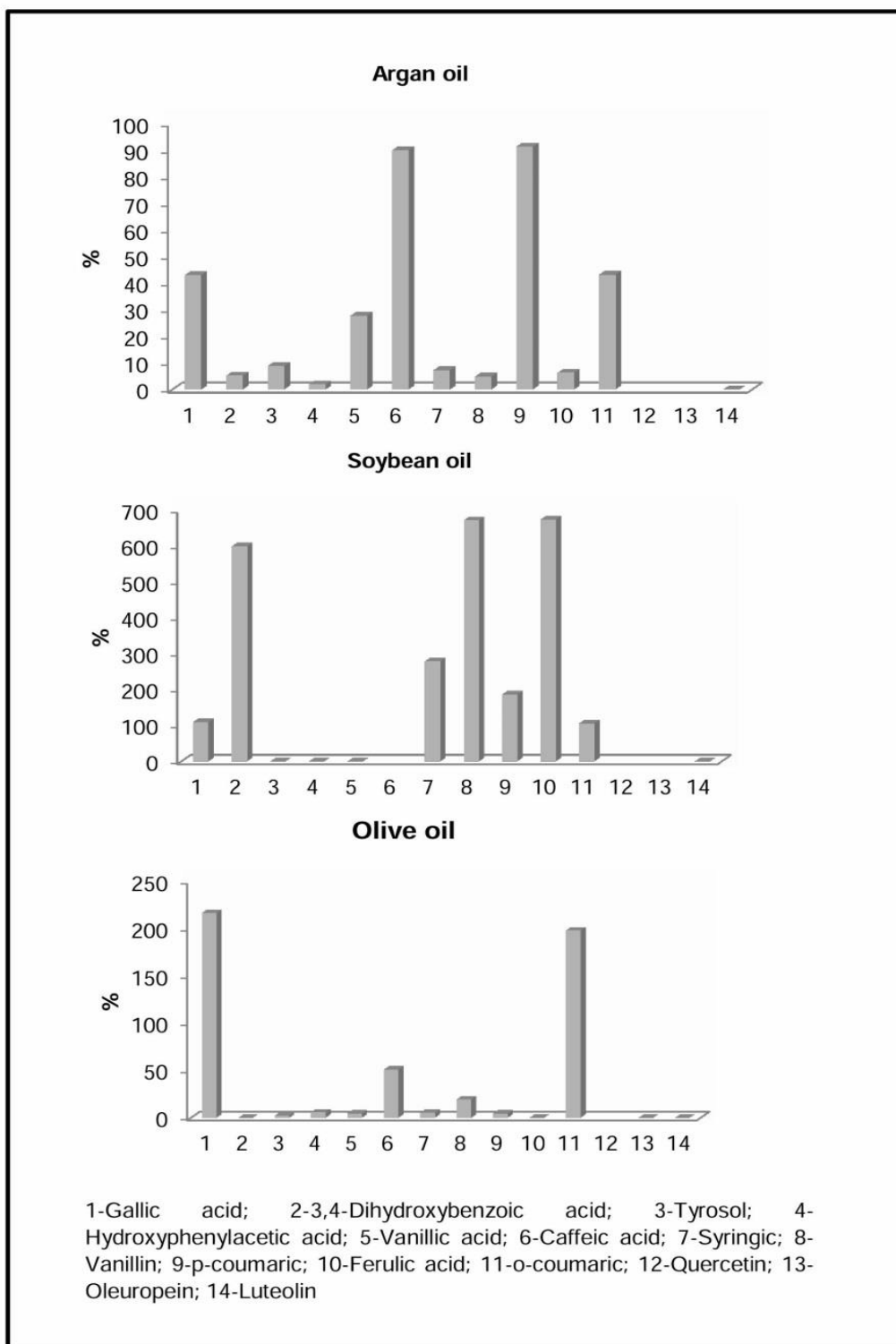


Fig. 4. Bioavailability of different polyphenols in argan oil, olive oil and soybean oil after the digestion process.

5. Análisis de la biodisponibilidad de los polifenoles y las propiedades antioxidantes del aceite de argán virgen extra mediante digestión simulada y absorción a través de células Caco-2. Estudio comparativo con el aceite de oliva virgen extra.

Cover Letter

Dear editor:

Here we send you the manuscript entitled **“Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil”**, to be considered for publication in Food Chemistry.

Argan oil is becoming increasingly popular as a luxury food with healthy properties. This paper analyzes the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of argan oil in comparison with olive oil, and highlights the importance of the changes that take place during the digestion process. In addition, the absorption across intestinal cells and the protective role of the bioaccessible fraction of the oils against induced oxidative stress is also examined.

All authors have read and approved this version of the manuscript and are prepared to take public responsibility for its contents. The manuscript has not been simultaneously submitted or published elsewhere.

Thank you very much,

Isabel Seiquer

On behalf of co-authors

***Highlights (for review)**

Highlights

Bioavailability of polyphenols and antioxidant capacity of argan oil is analyzed

The digestion process of oils greatly enhances their antioxidant activity

Large proportions of polyphenols from argan oil are absorbed by intestinal cells

Argan and olive oils protect in a similar way against induced ROS generation

40 **1. Introduction**

41 Virgin argan oil has been known for centuries in Morocco where it constitutes the
42 basic ingredient and sometimes exclusive source of vegetable fat in the “Amazigh diet”;
43 today, however, virgin argan oil has also a major and internationally well-established
44 presence in the edible-oil market (Charrouf & Guillaume, 2014). The combination of high
45 levels of unsaturated fatty acids and antioxidants, its pharmacological properties, delicate
46 flavor and unique taste, with notes of hazelnut and toasted almond, have led it to achieve a
47 significant share in the high quality virgin oil market (Gharby, Harhar, Guillaume, Haddad,
48 Matthäus, & Charrouf, 2011).

49 Virgin argan oil is characterized by high levels of linoleic and oleic acids and is rich in
50 polyphenols and tocopherols, which exhibit significant antioxidant activity. In addition, the
51 presence of minor bioactive compounds such as sterols, carotenoids, xanthophylls, squalene
52 and CoQ₁₀ contribute to its antioxidant potential, nutritional value and health properties
53 (Cabrera-Vique, Marfil, Giménez, & Martínez-Augustin, 2012; Charrouf & Guillaume,
54 2014). Recent studies have shown it to have hypolipidaemic, hypocholesterolaemic,
55 hypoglycaemic and antihypertensive effects as well as a possible role in cancer prevention
56 (Cherki, Berrougui, Drissi, Adlouni, & Khalil, 2006; El Monfalouti, Guillaume, Denhez, &
57 Charrouf, 2010; Sour et al., 2012; Cabrera-Vique, Marfil, Giménez, & Martínez-Augustin,
58 2012; Charrouf & Guillaume, 2014). Among the various components of the Mediterranean
59 diet, much attention has been paid to virgin olive oil, because its consumption is associated
60 with favorable cardiovascular outcomes (Sour et al., 2012); however, some countries, namely
61 those in the Maghreb area, also consume virgin argan oil in the habitual diet, and a growing
62 body of evidence suggests that this edible oil might have healthful effects, mostly as a result of
63 its antioxidant activity, that would reduce the incidence of cardiovascular disease and prostate
64 cancer.

65 However, to exert biological effect antioxidants must be bioavailable, and this
66 bioavailability depends on their release from the food matrix during the digestion process and
67 on their later absorption from the gut via the intestinal cells. To address this question, the
68 ideal approach would be to conduct an *in vivo* bioavailability study, but human studies are
69 time consuming, costly to perform and impractical for large-scale applications. *In vitro*
70 methods are a good alternative and generally consist of a simulation of gastrointestinal
71 digestion prior to analyte determination. This method has been widely used to evaluate
72 mineral bioaccessibility (Cabrera-Vique & Bouzas, 2009; Seiquer, Delgado-Andrade, Haro,
73 & Navarro, 2010) and bioactive compounds such as polyphenols (Jailani & Williamson,
74 2014), and also in testing the antioxidant properties of different foods after the simulated
75 digestion process (Dinnella, Minichino, D'Andrea, &Monteleone, 2007; Pastoriza, Delgado-
76 Andrade, Haro, & Rufián-Henares, 2011; Chen, Chen, Zhao, Luo, Li, & Gao, 2014). Studies
77 have also shown that significant amounts of bioactive compounds may remain in the residues
78 after *in vitro* digestion (Pastoriza, Delgado-Andrade, Haro, & Rufián-Henares, 2011), usually
79 ignored. In recent decades, *in vitro* methods have been improved by incorporating enterocyte-
80 like cell cultures, such as the Caco-2 cell line (Mesías, Seiquer, & Navarro, 2009; Jailani &
81 Williamson, 2014). In culture, this cell line exhibits many properties of the normal intestinal
82 epithelium, and it has been used as a suitable model to study the absorption of phenolics
83 (Soler et al., 2010) and antioxidant cellular response (Ruiz-Roca, Delgado-Andrade, Navarro,
84 & Seiquer, 2011). However, data regarding the bioaccessibility of antioxidant activity after
85 the digestion of oils are very limited (Dinnella, Minichino, D'Andrea, &Monteleone, 2007)
86 and there is no information in this respect concerning virgin argan oil. *In vitro* digestion
87 models can be used in combination with culture cells to characterise antioxidant activity
88 during digestion and to evaluate this activity at the cellular level; furthermore, this type of

89 model makes it possible to study the extent of intestinal absorption, which is an essential step
90 toward determining the potential impact of antioxidant properties on human health.

91 The aim of this study was to investigate the bioavailability of total phenolic content
92 and the antioxidant properties of extra virgin argan oil, using a combined model of *in vitro*
93 gastrointestinal digestion and Caco-2 cell cultures. Antioxidant activity from the bioaccessible
94 fraction was analyzed by *in vitro* assays and by testing the protective effect against an induced
95 oxidative stress at the cellular level. For comparative purposes, samples of extra virgin olive
96 oil, considered the healthiest fat model on the basis of its nutritional and antioxidant
97 properties, were run in parallel with those of virgin argan oil.

98

99 **2. Materials and methods**

100 *2.1. Chemicals*

101 All chemicals were analytical reagent grade or higher purity. Bidistilled deionized water
102 was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA). Methanol, Folin-
103 Ciocalteu reagent, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-
104 azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
105 (DPPH), pepsin, pancreatin, bile salts, HEPES and tert-butylhydroperoxide (*t*-BOOH) were
106 provided by Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). 2, 4, 6-tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
107 for the ferric reducing power (FRAP) method was obtained from Fluka Chemicals (Fluka
108 Chemicals, Madrid, Spain). Sodium bicarbonate, sodium carbonate and hydrochloric acid
109 (37%) were provided by Merck (Merck, Darmstadt, Germany). All cell culture media and cell
110 culture-grade chemicals were obtained from Sigma.

111

112 *2.2 Samples*

113 Two different commercial samples of extra virgin argan oil (EVA1 and EVA2), produced
114 in south-western Morocco and obtained by the half-industrialized method with cold pressing
115 and certified as ecological product, were purchased in specialist stores from Andalusia
116 (Spain). In addition, samples of Spanish extra virgin olive oil (Picual variety, protected
117 designation of origin “Montes de Granada”, Granada province, Spain) (EVO) were acquired
118 in local stores. This olive cultivar was selected because of its high polyphenol content and
119 antioxidant properties. According to information provided by the manufacturer, vitamin E
120 content (mg/100g) was 62, 45 and 19 in EVA1, EVA2 and EVO, respectively. The oil
121 samples were carefully handled to avoid contamination and correctly stored and maintained at
122 a temperature of 4°C until analysis.

123 In order to check the quality and appropriate conservation of the oil samples, the acid
124 value (expressed as percentage of oleic acid), the peroxide index (expressed as milli-
125 equivalents of active oxygen per kg of oil) and the K_{270} extinction coefficient (calculated from
126 absorption at 270 nm using a Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer, Waltham,
127 Massachusetts, USA) were measured, following the analytical methods of the Commission of
128 the European Communities (2003) as described elsewhere (Marfil, Cabrera-Vique, Giménez,
129 Bouzas, Martínez, & Sánchez, 2008).

130

131 *2.3. In vitro digestion*

132 The *in vitro* digestion procedure was performed according to the method described by
133 Mesías, Seiquer, and Navarro (2009) slightly modified. The method consists of two sequential
134 steps; an initial pepsin/HCl digestion to simulate gastric conditions, followed by a digestion
135 with bile salts/pancreatin to simulate duodenal digestion. Shortly before use, 0.8 g of pepsin
136 was dissolved in 5 mL of 0.1 M HCl. For intestinal digestion, 0.1 g of pancreatin and 62.5 mg
137 of bile salts were dissolved in 25 mL of 0.1 M NaHCO₃. One gram of oil samples was mixed

138 with 9 mL of bidistilled deionized water and sonicated (VibracellVCX 130, Sonics&
139 Materials INC, Danbury, Connecticut, USA). The pH was adjusted to 2 using HCl 1N. Pepsin
140 was added to a final concentration of 0.05 g of pepsin/g sample and the samples were
141 incubated at 37 °C in a shaking water bath (Bunsen, Madrid, Spain) at 110 oscillations/min
142 for 2 h for the gastric digestion. For the intestinal digestion, the pH of the digest was raised to
143 pH 6 with 1M NaHCO₃ dropwise, and 2.50 mL of pancreatin and bile salts mixture was
144 added. The pH was then adjusted to pH 7.5 with 1M NaHCO₃, and samples were incubated at
145 37°C at 110 oscillations/min for 2 h. After gastrointestinal digestion, the digestive enzymes
146 were inactivated by heat treatment for 4 min at 100°C in a polyethylenglycol bath. The
147 samples were then cooled by immersion in an ice bath and centrifuged at 10000 rpm for 30
148 min at 4°C (Sorvall RC 6 Plus centrifuge, Thermo Scientific, Madrid, Spain) to separate the
149 soluble or bioaccessible fraction (BF) and the residual fraction (RF). Throughout the process,
150 the samples were protected from light, cooled with an ice bath and submitted to sonication
151 previous to each step. The *in vitro* digestion procedure is briefly summarized in **Figure 1**.
152 Blank samples were run in parallel and analyzed to discard interferences due to the reagents
153 used in the digestion process.

154 BF and RF from the oils digest were reserved at -80°C and used to obtain measurements
155 of total polyphenols and antioxidant capacity. Aliquots of the BF were also used for Caco-2
156 cell experiments.

157

158 *2.4. Chemical extraction*

159 The chemical extraction for total polyphenols and antioxidant activity measurements was
160 performed in oil samples and in the RF from the simulated digestion, according to the
161 procedure described by Pérez-Jimenez and Saura-Calixto (2005). 250 mg of the oil samples,
162 or the total RF, were mixed with 2.5 mL of acidic methanol/water (50:50 v/v, pH 2), shaken

163 for 60 min at 220 rpm (circulating shaker OVAN, Barcelona, Spain) and centrifuged at 2500
164 g for 10 min at 4°C. The supernatant was recovered and a second extraction was performed
165 adding to the residue 2.5 mL of acetone/water (70:30, v/v). The supernatants were combined
166 and used for determinations. **Figure 1** shows a simple scheme of the process.

167

168 *2.5. Total polyphenols*

169 Total polyphenol content was determined following the Folin-Ciocalteu colorimetric
170 method as described by Saura-Calixto and Goñi (2006) with modifications. Ten µL of sample
171 and 10 µL of Folin-Ciocalteu reagent were mixed in 96-well multiwell plates and let stand
172 for 3 minutes. 200 µL of sodium carbonate solution (75g/L) were added, the volume was
173 made up to 250 µL with Milli-Q water, mixed and allowed to stand in the dark for 60 min.
174 The absorbance was measured at 750 nm using a Victor X3 multilabel plate reader (Waltham,
175 Massachusetts, USA) against a standard curve of gallic acid (0-250 mg/L).

176

177 *2.6. Antioxidant activity*

178 Three procedures were applied to test the antioxidant activity of the samples: the ABTS
179 and DPPH assays, to measure the free radical scavenger ability, and the FRAP method, to
180 study the ferric reducing antioxidant power. Aqueous solutions of Trolox were used for
181 calibration (0.01-0.1 mg/mL). The results were expressed as mM (ABTS and FRAP) or µM
182 (DPPH) equivalents of Trolox per kg of sample.

183 The ABTS assay was conducted as described by Rufián-Henares and Delgado-Andrade
184 (2009) with slight modifications. ABTS^{•+} was prepared 12-16 h before use by dissolving
185 ABTS 7 mM with 2.45 mM potassium persulphate, and then diluted in ethanol:water 50:50 to
186 an absorbance of 0.7±0.02. Twenty µL of the samples and 280 µL of ABTS solution were

187 incubated for 20 min in the dark and the absorbance was read at 730 nm in a Victor X3
188 multilabel plate reader.

189 For the DPPH assay (Morales & Jiménez-Pérez, 2001), 50 µL of the sample were mixed
190 with 250 µL of DPPH solution (74 mg/L in methanol freshly prepared). After incubation for
191 60 min, the absorbance was measured at 520 nm in a Victor X3 multilabel plate reader,
192 maintaining the temperature in the measurement chamber at 30°C. The FRAP method was
193 performed according to Rufián-Henares and Delgado-Andrade (2009). 280 µL of FRAP
194 reagent freshly prepared and warmed at 37°C, was mixed with 20 µL of sample. The FRAP
195 reagent contained 2.5 mL of a 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl plus 2.5 mL of 20 mM
196 FeCl₃ and 25 mL of 0.3 M acetate buffer, pH 3.6. The samples were incubated at 37° C for 30
197 minutes in the dark and the absorbance was read at 595 nm in Victor X3 multilabel plate
198 reader.

199

200 *2.7. Cell cultures*

201 Caco-2 cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC)
202 through the Cell Bank of Granada University at passage 45, and were used in the experiments
203 at passages 49-53. Culture flasks and bicameral chambers were purchased from Corning
204 Costar (Cambridge, MA, USA). The cells were maintained by serial passage in 75 cm² plastic
205 flasks containing high-glucose Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM),
206 with heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (10%), NaHCO₃ (3.7 g/L), nonessential amino
207 acids (1%), HEPES (15 mM), bovine insulin (0.1 UI/mL), and 1% antibiotic-antimycotic
208 solution. The cells were grown in an atmosphere of air/CO₂ (95:5) at 90% humidity and 37°C,
209 and given fresh medium every 2 days.

210 Prior to the cell culture experiments, the osmolarity of the BF was adjusted to 300
211 mOsm/kg (cryoscopic osmometer Osmomat 030-D, Berlin, Germany).

212

213 *2.7.1. Absorption assays*

214 Trypsinization and seeding of the cells into permeable polycarbonate filter supports
215 (Transwell, 24 mm diameter, 4.7 cm² area, 3 μm pore size, Costar) were performed as
216 described elsewhere (Seiquer, Aspe, Vaquero, & Navarro, 2001). The medium was changed
217 every second day, and cells were used for absorption experiments after 21 days of culture.
218 Cell monolayer integrity during differentiation of Caco-2 cells was monitored by determining
219 the absorption of the phenol red marker, as described by Ruiz-Roca, Navarro and Seiquer
220 (2008). Cell monolayers were used for absorption study when the leakage rate of phenol red
221 was lower than 2.5% per hour.

222 BF were used for the Caco-2 experiments diluted 1:2 (v:v) with DMEM without FBS,
223 since cell viability after 2 h of exposure to the samples in such conditions, assessed by trypan
224 blue exclusion, was never < 85-90%. For the absorption experiments, spent culture media was
225 aspirated from the apical and basolateral chambers and both cell surfaces were washed twice
226 with Hank's balanced salt solution (HBSS) at 37°C. Then 2.5 mL of the transport buffer (130
227 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄, 5 mmol/L glucose, and 50 mmol/L
228 HEPES, pH 7) was added to the basolateral chamber, and the diluted BF of each oil was
229 added to the apical chamber (1.5 mL). After an incubation period of 2h at 37°C in a
230 humidified air:CO₂ atmosphere, the buffer from the basolateral chamber was removed to
231 calculate the absorption of total polyphenols and the antioxidant activity across the cell
232 monolayer. Absorption was expressed as the percentage transported/well from the
233 experimental solution added to the apical chamber.

234

235 *2.7.2. Oxidative stress markers*

236 Two assays were used to assess antioxidant effects from the BF of the oils at the cellular
237 level: measurement of cell damage and generation of intracellular reactive oxygen species
238 (ROS). We studied the basal effect of oils on cell markers, and their protective effect against
239 induced oxidative stress, as described below.

240 Viability of the Caco-2 cells was assessed by a neutral red (NR) cytotoxicity assay
241 procedure, based on the ability of viable uninjured cells to actively incorporate NR, a
242 supravital dye, into lysosomes. Cells were seeded in 96-well microtitre plates at a density of
243 75000 cells/well in 100 μ L of medium, and maintained for 48 hours to allow adherence to the
244 wells. Growth medium was removed and 100 μ L of the diluted BF from the oils were added
245 to the cells. The control wells received DMEM without FBS. The Caco-2 cells were harvested
246 after 2 h exposure, and basal cell viability was measured. To study the protective effect of the
247 samples, the oil BF were removed after 2 h of incubation, the cell surfaces were washed with
248 HBSS and the oxidizing agent *t*-BOOH 5 mM (100 μ L/well) was added for 2 hours. Cell
249 viability was assessed by staining with NR (2 h at 37°C), followed by cell fixation (0.5%
250 formaldehyde, 0.1% CaCl₂ for 30 s at room temperature). Microtitre plates were washed by
251 three brief immersions in phosphate-buffered saline and the cells were lysed (50% ethanol,
252 1% acetic acid overnight at 4 °C). The optical densities of the resulting solutions were
253 measured at 550 nm using a BioRad Model 550 microplate reader (BioRad, Hercules,
254 California, USA). Cell viability results were expressed as a percentage from the data obtained
255 after incubation with complete DMEM, from at least two independent experiments (n \geq 5 per
256 experiment).

257 To determine ROS generation we used the dichlorofluorescein (DCF) assay described by
258 Goya et al. (2007) with modifications. The cells were cultured in 24-well multiwell plates at a
259 density of 2×10^5 cells/well in 1 mL of medium, and incubated at 37°C for 48 hours. Cells
260 were pretreated with 1 mL of the BF from the oil digests and incubated for 2 hours. The

261 control wells received FBS-free DMEM. The medium was then discarded and cells were
262 treated with DCFH 100 μ M and incubated for 1 hour. The DCFH was removed and culture
263 medium (for basal measurements) or *t*-BOOH 5 mM (to study the protective effect against
264 oxidation) was added to the wells. The absorbance was immediately measured in the plate
265 reader at a wavelength of 485 nm excitation and 535 nm emission, at a constant temperature
266 of 37°C at 0, 20, 50, 70 and 90 minutes. DCFH is converted into dichorofluorescein (DCH) in
267 the presence of ROS and emits fluorescence.

268

269 *2.8. Statistical analysis*

270 Data from the *in vitro* and cell culture assays were statistically tested by one-way
271 analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple-range test to compare means
272 that showed significant variation ($P<0.05$). The relationships between the different variables
273 were evaluated by computing the corresponding correlation coefficient (Pearson linear
274 correlation) at the $P<0.05$ confidence level. The StatGraphics Centurion XV software
275 (StatPoint Technologies, Inc. USA, 2006) was used to carry out the comparisons.

276

277 **3. Results and discussion**

278 *3.1. Acid value, peroxide value and K_{270} .*

279 Results of the quality parameters determined in the oil samples examined in this study
280 are shown in **Table 1**. All the argan oil samples met the required values of acidity, peroxide
281 index and K_{270} for the "extra virgin argan oil" quality category, according to the standard NM
282 08.5.090 (2003). In the same manner, in the extra virgin olive oil used for the experiments
283 these quality parameters were within the ranges established by the International Regulations
284 for these quality parameters (Commission of the European Communities, 2003).

285

286 *3.2. Initial content and bioaccessibility of polyphenols and antioxidant properties*

287 In this experimental study, we first determined the extractable polyphenols and
288 antioxidant properties in methanol/water:acetone/water, as a first chemical approach to
289 investigate antioxidant activity in argan oils. Bioaccessibility, defined as the amount of a food
290 constituent that is present in the gut as a consequence of its release from the food matrix, is
291 the first requisite for bioactive compounds to achieve any effect in a specific tissue or organ.
292 Thus, phenol content and antioxidant activity were also analyzed in the BF obtained after the
293 *in vitro* digestion of oils, and the increase on the values obtained from the initial extracts was
294 calculated (fold increase). These data are presented in **Table 1**. In addition, phenol content
295 and antioxidant activity were investigated in the RF and relative bioaccessible and residual
296 fractions were calculated as percentages of the total amount recovered after simulated
297 digestion (**Figure 2**).

298 Polyphenol content in chemical extracts of EVA oils was similar to that reported in
299 previous studies (Marfil et al., 2011) and, as expected, the values in the extra virgin olive oil
300 were significantly higher. However, during digestion the increase in the phenol content
301 observed in the EVA1 and EVA2 samples (≈ 20 fold) was much greater than for EVO (≈ 3
302 fold). Nevertheless, due to the large initial differences, the bioaccessible phenol content
303 remained significantly higher in EVO than in the EVA samples. Significant increases in
304 phenolic compounds after *in vitro* digestion have also been found in different plant foods
305 (Saura-Calixto, Serrano, & Goñi, 2007), particularly in fruits (Chen, Chen, Zhao, Luo, Li, &
306 Gao, 2014). According to other authors, the determination of food polyphenols in aqueous
307 organic extracts is limited since some compounds may escape the standard extraction
308 methods, but could be released from the food matrix by the action of digestive enzymes
309 (Saura-Calixto, Serrano, & Goñi, 2007). It has also been suggested that a proportion of the
310 phenol compounds could be transformed during digestion into different structural forms with

311 different chemical properties and bioaccessibility, especially after the intestinal phase, since
312 polyphenols are highly sensitive to alkaline conditions (Chen, Chen, Zhao, Luo, Li, & Gao,
313 2014). All the major olive oil phenols shown good stability in the gastric phase of digestion,
314 although very low levels of stability when exposed to small-intestine conditions (Soler et al.,
315 2010). Therefore, the different phenolic composition of EVA and EVO (Charrouf &
316 Guillaume, 2007; Suárez, Macià, Romero, & Moltiva, 2008) seems to determine the different
317 behavior of the phenolic fraction under conditions of the digestive process (Dinnella,
318 Minichino, D'Andrea, & Moteleone, 2007). Moreover, around 11% of the total phenols
319 recovered after digestion of EVA were detected in the residual fraction, i.e., they were not
320 available to be absorbed in the small intestine, versus only 2.82% in EVO ($P<0.0001$) (**Figure**
321 **2, A**). Saura-Calixto, Serrano and Goñi (2007) studied the bioaccessibility of total
322 polyphenols in a whole diet and also showed that small amounts (10%) were associated with
323 the residues and remained in the food matrix after the digestion process. It has been suggested
324 that non-absorbable phenolic compounds exert local antioxidant activities in the
325 gastrointestinal tract (Ursini, Zamburlini, Cazzolato, Maiorino, Bon, & Sevanian, 1998). Most
326 studies on polyphenols bioaccessibility of edible oils have been performed using single
327 compounds (Soler et al. 2010; Dinnella, Minichino, D'Andrea, & Moteleone, 2007), although
328 when included in a mixture of polyphenols their bioaccessibility may be substantially
329 different (Saura-Calixto, Serrano, & Goñi, 2007). High values of bioaccessibility and stability
330 after *in vitro* digestion have been observed for tyrosol (Dinnella, Minichino, D'Andrea, &
331 Moteleone, 2007) and hydroxytyrosol (Rubio et al., 2014); however, using linear regression
332 models based on the total bioaccessibility of tyrosol, Dinnella, Minichino, D'Andrea and
333 Moteleone (2007) reported that in extra virgin olive oils only a certain fraction of the phenols
334 (37-90%) is bioaccessible after *in vitro* digestion and dialysis process.

335 Few data exist in the literature on the stability of antioxidant properties of oils during
336 the *in vitro* digestion process, and none concerning argan oil. As expected, significantly
337 higher values of ABTS, DPPH and FRAP were found in EVO than in the EVA samples, both
338 in the initial chemical extract and in the bioaccessible fractions (**Table 2**). Polyphenols are
339 known to be the main contributors to the antioxidant activity of oils (Tuck & Hayball, 2002)
340 and, in fact, strong correlations were found before and after *in vitro* digestion between phenol
341 content and the ABTS, DPPH and FRAP assays (all $P < 0.001$). However, in a similar way to
342 the outcome observed for total phenols, the increase for argan oil during *in vitro* digestion was
343 always greater than that for olive oil. This finding suggests that phenolic compounds of argan
344 oil are rapidly released from the food matrix under physiological conditions of the digestion
345 process, and that these compounds maintain the antioxidant properties as measured in the
346 present assay. Corroborating our results, other authors have observed higher values of
347 antioxidant activity after the digestion process of fresh and processed foods (Pastoriza,
348 Delgado-Andrade, Haro, & Rufián-Henares, 2011) as well as in different fruits (Chen, Chen,
349 Zhao, Luo, Li, & Gao, 2014), compared with the initial chemical extracts. On the contrary,
350 Dinnella, Minichino, D'Andrea and Moteleone (2007) found a negative effect of the digestion
351 process in the antioxidant activity of extra virgin olive oils, by measuring ABTS in the
352 dialyzed fraction obtained after *in vitro* digestion. During the digestive process, antioxidants
353 probably undergo modifications which increase their reactivity, especially due to the changes
354 in pH, as the pH of a substance is known to affect the racemization of molecules creating
355 enantiomers with different biological reactivity (Wootton-Beard, Moran, & Ryan, 2011). As a
356 result, new compounds with higher capacities to scavenge free radicals (ABTS and DPPH
357 assays) and to reduce oxidants (FRAP) could be formed. In spite of the large increase in
358 antioxidant activity during the digestion of EVA, the antioxidant bioaccessible properties
359 were still higher for the EVO samples, which highlights the health benefits of olive oil (Soler

360 et al. 2010). The differences observed may be attributed to phenolic composition, since the
361 antioxidant behavior of food products in the digestive tract is strongly affected by the
362 chemical structure of the phenols (Spencer, 2003).

363 Analysis of the residual fractions of digests indicates that a small proportion of
364 antiradical activity (ranging from 0% of DPPH to 2% of ABTS) remains as non-absorbable
365 after the *in vitro* digestion of the argan oil samples (**Figure 2, B, C**), whereas the residual
366 activity values in EVO were significantly higher (3.5% for ABTS and 6.7% for DPPH). On
367 the contrary, the percentage of residual reducing power was greater in EVA1 (30.7%) and
368 EVA2 (25.5%) than in EVO (4.7%) (**Figure 2, D**). These results confirm that the residues are
369 biologically actives and may exert antioxidant activity by a surface reaction phenomenon, or
370 even could be metabolized by the microflora and partially absorbed in the final segments of
371 the intestine (Pastoriza, Delgado-Andrade, Haro, & Rufián-Henares, 2011).

372

373 *3.3. Absorption across Caco-2 cells*

374 The second major requirement for *in vivo* antioxidant actions to take place is that of
375 absorption across the intestinal epithelium. **Table 3** shows the results of the absorption of
376 total phenols and antioxidant activity across Caco-2 cells after incubation with the BF
377 obtained after *in vitro* digestion of the oils. These results were calculated as the percentage of
378 the total initial content exposed to cell monolayers. Considerable proportions of total phenols
379 (69-95%) from EVA digest cross the intestinal cells, in amounts significantly higher than that
380 from EVO (25%). Tyrosol and hydroxytyrosol, which are among the main phenols in olive
381 oil, cross Caco-2 monolayers by passive diffusion (Manna, Galletti, Misto, Cucciola,
382 D'angelo, & Zappia, 2000) and are absorbed by humans in a dose-dependent manner (Visioli
383 et al., 2000). Experiments on the metabolism of virgin olive oil phenols in Caco-2 and Caco-
384 2/TC7 cell culture models have shown that olive oil phenols are subject to biotransformation

385 and conjugation in the small intestine, influencing the efflux of the compounds from inside
386 the enterocytes (Rubio et al., 2014; Soler et al., 2010). Thus, after incubation with cells, native
387 phenols and their metabolites exhibit preferential apical-to-basolateral transport, although
388 they are also detected in apical and cellular compartments (Soler et al., 2010). Our results
389 suggest that polyphenols from argan oil can be considered highly bioavailable; although they
390 are present in smaller bioaccessible quantities than phenols from olive oil, they are absorbed
391 in higher proportions.

392 We also evaluated absorption of antioxidant activity, by measuring ABTS, DPPH and
393 FRAP values in the basolateral compartments after incubation. There were no differences in
394 the percentage of ABTS activity absorbed from the different oil samples; DPPH values were
395 higher for EVA2 than for EVA1 and EVO, which in turn, were similar. FRAP absorbed from
396 argan samples were higher than in the EVO sample. Therefore, the higher relative absorption
397 of polyphenols from argan oil did not always led to an increased passage of antiradical
398 activity, but did increase the reducing power, compared with olive oil. To the best of our
399 knowledge, this is the first study on the bioavailability of the antioxidant properties of extra
400 virgin argan oil.

401

402 *3.4. Antioxidant cellular markers*

403 In addition to conducting *in vitro* assays, it is interesting to study the antioxidant post-
404 digestion properties of foods at the cell level. The intestine is the primary site of action for
405 dietary antioxidant agents and this is also where lipid peroxidation is very likely to occur, as it
406 may derive from that present in cell membranes and in dietary fats; thus, enterocyte-like
407 Caco-2 cells are a suitable model to investigate the antioxidant effect of food components,
408 and they have been previously used to study the oxidative stress prevention properties of olive
409 oil hydroxytyrosol (Rodriguez-Ramiro, Martín, Ramos, Bravo, & Goya, 2011).

410 **Table 4** shows the results obtained from our study of the protective role of the
411 bioaccessible antioxidants of oils against induced oxidative stress. First, we checked the basal
412 effect of the oil digests on cell viability and ROS production in Caco-2 cells, finding that
413 incubating the cells for 2h with bioaccessible fractions of argan and olive oils did not
414 significantly affect cell viability or ROS levels, compared with control cells incubated with
415 culture medium. However, when isolated phenolic compounds, like hydroxytyrosol, have
416 been assayed, decreased ROS generation was observed after 4h of incubation with Caco-2
417 cells (Rodriguez-Ramiro, Martín, Ramos, Bravo, & Goya, 2011). This supports the idea that
418 the antioxidant properties of initial phenolic compounds may have been altered during the
419 digestive process.

420 The treatment of cells with 5mM *t*-BOOH reduced cell viability to 50%, clearly
421 showing the harmful effect of the peroxide. In addition, the oxidant effect of *t*-BOOH led to a
422 drastic increase of ROS generation compared with unstressed cells. Pre-incubation for 2h of
423 Caco-2 cultures with argan oil digests alleviated the cell damage provoked by *t*-BOOH,
424 although differences with viability of stressed cells were significant only for EVA1. Pre-
425 incubation with olive oil in the same conditions clearly had a protective effect against cell
426 injury, producing cell viability values that were significantly different from those of oxidized
427 cells and those pre-incubated with either of the EVA samples. The high values of ROS
428 production observed in cells treated with the pro-oxidant agent were significantly reduced
429 when cells were pre-incubated with EVA1, EVA2 and EVO, with no differences between the
430 three cases. Very little is known about the antioxidant effects of digested foods in cell
431 oxidative markers; Cilla, Laparra, Alegría, Barbera and Farre (2008) studied the antioxidant
432 effects produced by bioaccessible fractions of fruit beverages in Caco-2, and observed a
433 protective role against H₂O₂-induced oxidative stress but no effect in preventing intracellular
434 ROS accumulation. The effects of isolated phenolic compounds in reducing ROS production

435 in cells are disparate; it has been shown that preincubation of Caco-2 cultures with quercetin,
436 luteolin and hydroxytyrosol significantly decreases intracellular ROS production, while
437 apigenin and others have no such effect (Yokomizo & Moriwaki, 2006; Rodriguez-Ramiro,
438 Martín, Ramos, Bravo, & Goya, 2011). The protective effect of quercetin and rutin against *t*-
439 BOOH oxidation has also been demonstrated in red blood cell cultures (Cesquini, Torsoni,
440 Stoppa and Ogo, 2003). Our results show, for the first time, that bioaccessible fractions of
441 extra virgin argan oil have a significant effect in preventing induced-ROS cell generation;
442 moreover, this effect may be related with their capacity to scavenge free radicals and with
443 their reducing power, as both properties were detected in the samples assayed, although
444 another mechanism could also be involved.

445

446 **4. Conclusions**

447 In this paper, the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra
448 virgin argan oil is evaluated for the first time, and compared with those of extra virgin olive
449 oil. The results highlight the importance of determining these variables in the bioaccessible
450 fraction obtained after digestion of the oil samples, since during digestion significant changes
451 occur, increasing the amount of phenols and heightening antioxidant activity. The increased
452 phenol content observed after digestion of argan oil never surpassed that of olive oil, nor its
453 antioxidant activity. However, a similar preventive effect of ROS production was detected for
454 bioaccessible fractions of argan and olive oil, against induced oxidative stress. Moreover,
455 large proportions of phenol compounds and antioxidant activity were absorbed across Caco-2
456 cells monolayers from argan oil digests, sometimes in percentages exceeding those of olive
457 oil. Therefore, we conclude that polyphenols from extra virgin argan oil are highly
458 bioavailable and that this oil presents high antioxidant potential, which can be considered very
459 positive for establishing and interpreting its healthy-giving in vivo properties.

460

461 **5. References**

462 Cabrera-Vique C., & Bouzas, P. R. (2009). Chromium and manganese levels in convenience
463 and fast foods: in vitro study of dialyzable fraction. *Food Chemistry*, *117*, 757-763.

464 Cabrera-Vique, C., Marfil, R., Giménez, R., & Martínez-Augustin, O. (2012). Bioactive
465 compounds and nutritional significance of virgin argan oil – an edible oil with potential as
466 a functional food. *Nutrition Reviews*, *70*(5), 266–279.

467 Cesquini, M., Torsoni, M. A., Stoppa, G. R., & Ogo, S. H. (2003). *t*-BOOH-induced oxidative
468 damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine &*
469 *Pharmacotherapy*, *57*, 124-129.

470 Cilla, A., Laparra, J. M., Alegria, A., Barbera, R., & Farre, R. (2008). Antioxidant effect
471 derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative
472 stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry*, *106*, 1180-1187.

473 Charrouf, Z., & Guillaume, D. (2014). Argan oil, the 35-years-of-research product. *European*
474 *Journal of Lipid Science and Technology*, *116*, 1-5.

475 Charrouf, Z., & Guillaume, D. (2007). Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*.
476 *American Journal of Food Technology*, *2*, 679-683.

477 Chen, G. L., Chen, S. G., Zhao, Y. Y., Luo, C. X., Li, J., & Gao, Y. Q. (2014). Total phenolic
478 contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion.
479 *Industrial Crops and Products*, *57*, 150-157.

480 Cherki, M., Berrougui, H., Drissi, A., Adlouni, A., & Khalil A. (2006). Argan oil: Which
481 benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacological Research*, *54*: 1-5.

482 Commission of the European Communities. (2003). Regulation 2568/91 on the characteristics
483 of olive oil and olive residue oil and the relevant methods of analysis. *Official Journal of*
484 *European Communities*, *248*, 1-109.

20

- 485 Dinnela, C., Minichino, P., D'Andrea, A. M., & Moteleone, E. (2007). Bioaccessibility and
486 antioxidant activity of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during *in vitro*-
487 digestion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *55*, 8423-8429.
- 488 El Monfalouti, H., Guillaume, D., Denhez, C., & Charrouf, Z. (2010). Therapeutic potential
489 of argan oil: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* *62*, 1669-1675.
- 490 Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Haddad, A., Matthäus, B., & Charrouf, Z. (2011).
491 Oxidative stability of edible argan oil: A two-year study. *LWT-Food Science and*
492 *Technology*, *44*, 1-8.
- 493 Goya, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2007). Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on
494 human hepatoma HepG2 cells-Protection against oxidative stress induced by tert-
495 butylhydroperoxide. *European Journal of Nutrition*, *46*, 70-78.
- 496 Jailani, F., & Williamson, G. (2014). Effect of edible oils on quercetin, kaempferol and
497 galangin transport and conjugation in the intestinal Caco-2/HT29-MTX co-culture model.
498 *Food and Function*, *5*, 653-662.
- 499 Manna, C., Galletti, P., Misto, G., Cucciola, V., D'angelo, S. & Zappia, V. (2000). Transport
500 mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters*, *470*,
501 341-344.
- 502 Marfil, R., Cabrera-Vique, C., Giménez, R., Bouzas, P. R., Martínez, O., & Sánchez, J. A.
503 (2008). Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin
504 argan oil: influence of the extraction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
505 *56*, 7279-7284.
- 506 Marfil, R., Giménez, R., Martinez, O., Bouzas, P. R., Rufián-Henares, J. A., Mesías, M., &
507 Cabrera-Vique, C. (2011). Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant
508 capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, *Skeels*). *European Journal of Lipid Science*
509 *and Technology*, *113*, 886–893.

510 Mesías, M., Seiquer, I., & Navarro, M. P. (2009). Influence of diets rich in Maillard reaction
511 products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells.
512 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 9532-9538.

513 Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard
514 reaction products as related to colour and fluorescence. *Journal of Agriculture and Food*
515 *Chemistry*, *72*, 119-125.

516 Norme Marocaine NM 08.5.090. (2003). Service de Normalisation Industrielle (Snima):
517 huiles d'arganes. Spécifications. Snima, Rabat, Morocco.

518 Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Rufián-Henares, J. A. (2011). A physiologic
519 approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food*
520 *Chemistry*, *129*, 1926-1932.

521 Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual
522 antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *53*, 5036-
523 5040.

524 Rodriguez-Ramiro, R., Martín, M.A., Ramos, S., Bravo, L., & Goya, L. (2011). Olive oil
525 hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by
526 preventing oxidative stress. *Toxicology*, *288*, 43-48.

527 Rubió, L., Macià, A., Castell-Auví, A., Pinent, M., Blay, M. T. Ardévol, A., Romero, M. P.,
528 & Motilva, M. (2014). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the
529 phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models.
530 *Food Chemistry*, *149*, 277-284.

531 Rufián-Henares, J.A., & Delgado-Andrade, C. (2009). Effect of digestive process on Maillard
532 reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Research*
533 *International*, *42*, 394-400.

- 534 Ruiz-Roca, B., Navarro, M. P., & Seiquer, I. (2008). Antioxidant properties and metal
535 chelating activity of glucose-lysine heated mixtures. Relationships with mineral absorption
536 across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *56*, 9056-
537 9063.
- 538 Ruiz-Roca, B., Delgado-Andrade, C., Navarro, M. P., & Seiquer, I. (2011) Effects of Maillard
539 reaction products model systems on oxidative stress markers and against oxidative
540 induction by hydrogen peroxide in Caco-2 cells. *Journal of Food and Nutrition Research*,
541 *50*, 237-248.
- 542 Saura-Calixto, F., & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean
543 diet. *Food Chemistry*, *94*, 442-447.
- 544 Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total
545 polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*, 492-501.
- 546 Seiquer, I., Delgado-Andrade, C., Haro, A. & Navarro, M.P. (2010). Assessing the effects of
547 severe heat treatment of milk on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* studies,
548 *Journal of Dairy Science*, *93*, 5635-5643.
- 549 Seiquer, I., Aspe, T., Vaquero, P., & Navarro, P. (2001). Effects of heat treatment of casein in
550 the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* assays.
551 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 1049-1055.
- 552 Soler, A., Porero, M. P., Maciá, A., Saha, S., Furniss, C. S. M., Kroon, P. A. & Motilva M. J.
553 (2010). Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil
554 phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chemistry*,
555 *119*, 703-714.
- 556 Sour, S., Belarbi, M., Khaldi, D., Benmansour, N., Sari, N., Nani, A., Chemat, F., & Visioli,
557 F. (2012). Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *British Journal of*
558 *Nutrition*, *107*, 1800-1805.

559 Spencer, J. P. E. (2003). Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *Journal of*
560 *Nutrition*, *133*, 3255S-3261S.

561 Suárez, M., Macià, A., Romero, M. P., & Moltiva, M. J. (2008). Improved liquid
562 chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic
563 compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, *1214*, 90-99.

564 Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and
565 health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 636-644.

566 Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., Maiorino, M., Bon, G.B., & Sevanian, A. (1998).
567 Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis.
568 *Free Radical Biology and Medicine*, *25*, 250–252.

569 Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., & Caruso, D. (2000). Olive
570 oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, *468*, 159-160.

571 Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant
572 capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before
573 and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteau
574 methods. *Food Research International*, *44*, 217-224.

575 Yokomizo, A., & Moriwaki, M. (2006). Effects of flavonoids on oxidative stress induced by
576 hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Bioscience, Biotechnology and*
577 *Biochemistry*, *70*, 1317-1324.

578

579

580

581 **Figure captions.**

582

583 **Figure 1.** Scheme of the general procedure applied to the oil samples. ROS: reactive
584 oxygen species.

585

586 **Figure 2.** Contribution of the bioaccessible and residual fractions (%) to the total
587 polyphenols (A), ABTS (B), DPPH (C) and FRAP (D) recovered after *in vitro* digestion of
588 the oil samples. EVA, extra virgin argan oil; EVO, extra virgin olive oil. Different letters
589 indicate significant differences within bioaccessible or residual fractions ($p < 0.05$, ANOVA
590 and Duncan's test). No DPPH activity was detected in residual fractions of EVA samples.

591

592

593

594

595

596

597

598 **Table 1**

599 Acid value, peroxide value and K_{270} of the oil samples.^a

	EVA 1	EVA 2	EVO
Acidity (%)	0.30±0.006 ^a	0.72±0.025 ^b	0.26±0.047 ^a
Peroxide index (meq O ₂ /kg)	5.93±0.015 ^a	11.62±0.025 ^b	4.42±1.34 ^a
K_{270}	0.39±0.011 ^a	1.45±0.011 ^b	0.13±0.605 ^c

600 ^a EVA, extra virgin argan oil; EVO, extra virgin olive oil.

601 Values are means ± SD (n=4). Values with different superscript letters within each file are
602 significantly different at p<0.05 (ANOVA and Duncan's multiple range test).

603

604

605 **Table 2**

606 Total polyphenols, ABTS, DPPH and FRAP in the chemical extracts and in the bioaccessible
 607 fraction after in vitro digestion of the oil samples.^a

	EVA 1	EVA 2	EVO
Polyphenols (mg galic acid/kg)			
Chemical extract	21.59±2.27 ^a	22.28±4.18 ^a	368±32 ^b
Bioaccessible fraction	557±83 ^a	446±89 ^a	1029±221 ^b
Increase after digestion (fold)	25.73±2.11 ^a	20.15±2.38 ^b	2.81±0.73 ^c
ABTS (mM equivalent Trolox/kg)			
Chemical extract	0.166±0.013 ^a	0.037±0.011 ^b	3.03±0.044 ^c
Bioaccessible fraction	6.97±0.065 ^a	5.58±0.295 ^b	7.90±0.029 ^c
Increase after digestion (fold)	42.16±3.34 ^a	171±47 ^b	2.61±0.05 ^c
DPPH (µM equivalent Trolox/kg)			
Chemical extract	182±2 ^a	103±21 ^b	652±1 ^c
Bioaccessible fraction	490±40 ^a	513±49 ^a	879±10 ^b
Increase after digestion (fold)	2.68±0.19 ^a	5.09±0.53 ^b	1.35±0.01 ^c
FRAP (mM equivalent Trolox/kg)			
Chemical extract	0.115±0.008 ^a	0.135±0.009 ^a	2.22±0.05 ^b
Bioaccessible fraction	1.37±0.04 ^a	1.68±0.13 ^b	3.25±0.18 ^c
Increase after digestion (fold)	11.88±0.81 ^a	12.49±0.79 ^a	1.46±0.08 ^b

608 ^a EVA, extra virgin argan oil; EVO, extra virgin olive oil.

609 Values are means ± SD (n=4). Values with different superscript letters within each file are
 610 significant different at p<0.05 (ANOVA and Duncan's multiple range test).

611

612

613 **Table 3**

614 Absorption of total polyphenols, ABTS, DPPH and FRAP (% from the initial solution) across
615 Caco-2 monolayers after 2 h of incubation with the bioaccessible fractions of the oil
616 samples.^{a,b}

	EVA 1	EVA 2	EVO
Total polyphenols	64.14±6.31 ^a	95.11±2.88 ^b	25.41±5.07 ^a
ABTS	28.70±3.85	26.77±3.82	32.80±8.09
DPPH	3.26±0.85 ^a	4.50±0.23 ^b	2.27±0.22 ^a
FRAP	20.20±4.51 ^a	13.32±2.49 ^b	5.75±0.11 ^c

617 ^a EVA, extra virgin argan oil; EVO, extra virgin olive oil.

618 ^b Data were calculated as the percentage absorbed in the basal chamber from the initial
619 quantity in the apical chamber. Values are means ± SD (n=4). Values with different
620 superscript letters within each file are significant different at p<0.05 (ANOVA and Duncan's
621 multiple range test).

622

623

Figure 1

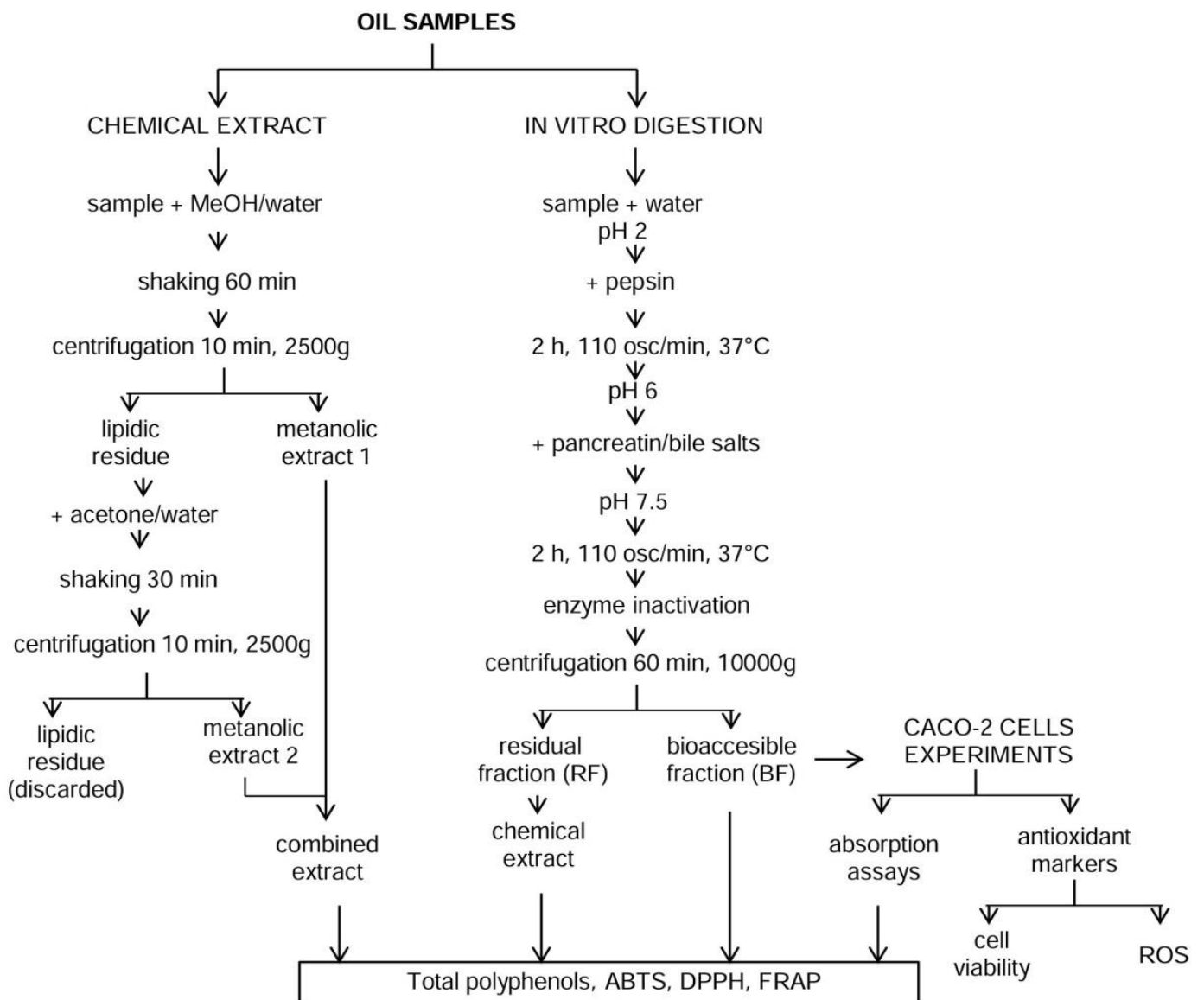
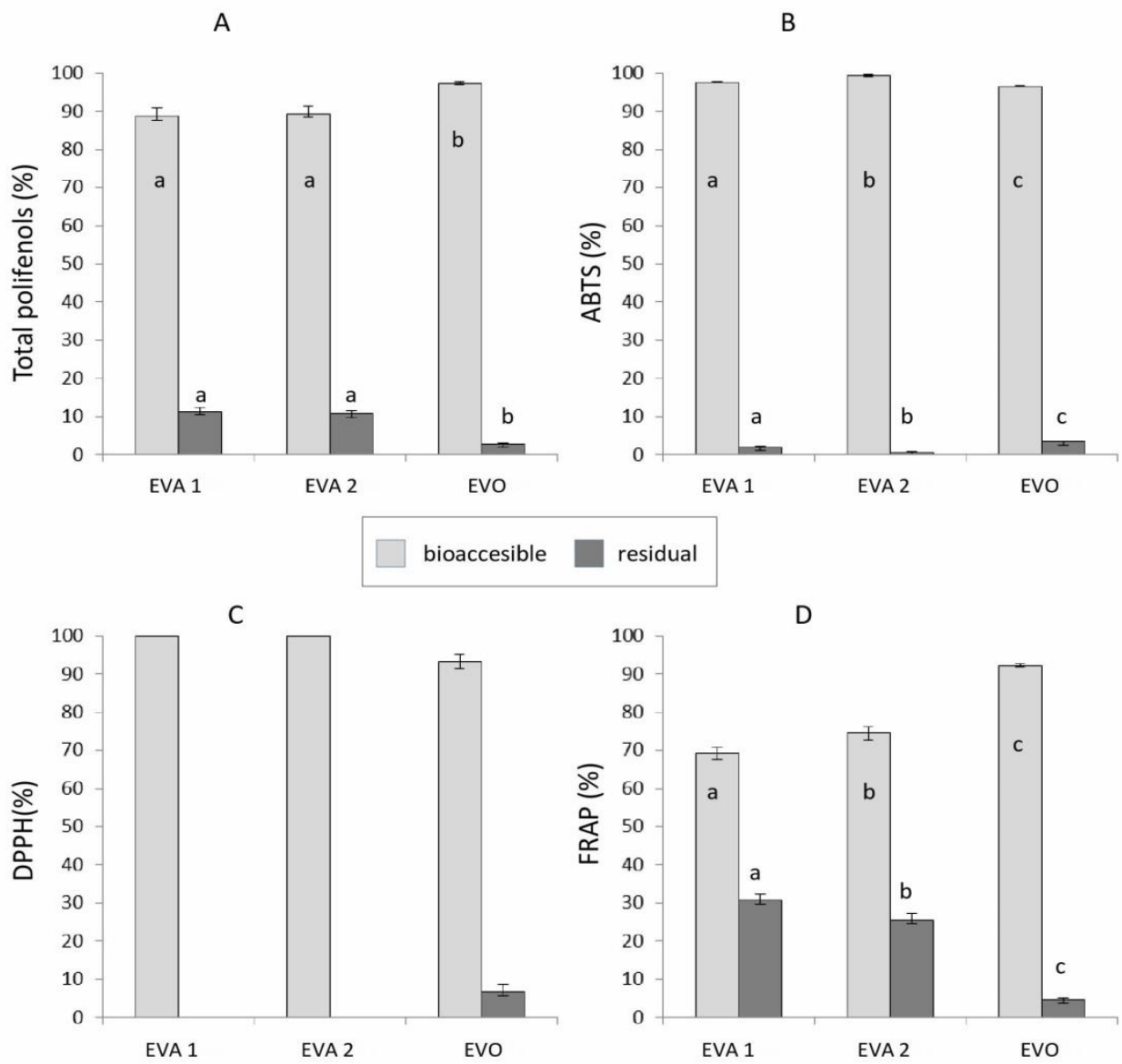


Figure 2





VI. RESÚMEN



El **árbol del argán** es una especie endémica y con una extraordinaria tradición etnobotánica entre los pueblos bereberes del suroeste de Marruecos. También se cultiva en el norte del Sáhara Occidental (en las cercanías de El Aaiún y Smara) y en la provincia de Tindouf (oeste de Argelia). En estos lugares ejerce un papel esencial en la estabilidad de ecosistemas especialmente áridos. Por esta razón y por el enorme interés que ha despertado el aceite que se obtiene de sus semillas, hoy día se investiga a fondo su posible implantación en zonas limítrofes y en otros países como Israel, a través de proyectos financiados por la UNESCO y otros organismos internacionales.

El aceite de argán es un **aceite virgen**, no sometido a proceso de refinado, que es consumido desde hace siglos en los lugares de origen, llegando a suponer hasta el 25% de la ingesta lipídica diaria en la dieta bereber (*Amazigh diet*). Fuera de estas latitudes, y hasta hace un par de décadas, era considerado un producto exótico, adquirido por visitantes y turistas. Este hecho ha cambiado de forma radical, y en la actualidad está adquiriendo considerable interés gastronómico, nutricional, terapéutico y cosmético en otros países, siendo considerado el “oro del desierto”.

Desde el punto de vista **gastronómico**, es muy apreciado por sus propiedades organolépticas; presenta un color que oscila de “dorado” a “caoba” en función del grado de tostado de las semillas, sabor suave y notas aromáticas a “avellana” “sésamo” y “almendra tostada”. En algunos países, se considera incluso un producto *gourmet* y cada vez es mayor su presencia en el mercado internacional, en países como Francia, Alemania, Bélgica, Estados Unidos o Japón.

En cuanto a su **valor dietético**, se caracteriza por un perfil en ácidos grasos con predominio de los ácidos oleico y linoleico, y por un alto contenido en antioxidantes, fundamentalmente tocoferoles. También polifenoles y otros compuestos minoritarios como esteroides, carotenoides, xantofilas, escualeno y CoQ₁₀ contribuyen a su potencial antioxidante, que algunos autores asemejan al aceite de oliva virgen.

Desde la antigüedad se le han atribuido interesantes **propiedades curativas y terapéuticas**, pero han sido estudios recientes como los liderados por los Dres. Charrouf, Guillaume, Drissi o Cherki, los que han demostrado de forma fehaciente, los

efectos saludables derivados del consumo habitual de aceite de argán, especialmente en relación con las enfermedades cardiovasculares. Se ha descrito un efecto hipolipemiante, hipocolesterolémico, antihipertensivo e hipoglucémico. También se ha puesto de manifiesto un posible papel preventivo en procesos cancerígenos, como cáncer de próstata. En el campo de la **cosmética**, son muchos los autores que coinciden en que ha sido el “producto revelación” de este siglo, con una más que notable expansión comercial y aceptación por el consumidor. Entre sus beneficios como ingrediente bioactivo de cremas, lociones, etc. se indica su papel regenerador de la piel y como protector frente a radicales libres y a la fotooxidación.

A pesar de esta creciente investigación e interés por el aceite de argán, tanto la bibliografía como nuestras investigaciones previas, muestran valores muy dispares en cuanto a su composición, aun tratándose de una zona de producción geográficamente tan restringida. Este hecho puede ser atribuido a un escaso control de calidad tanto a nivel de materia prima como de métodos de obtención y de conservación. La reciente mecanización parcial de los procesos tecnológicos y un mayor control por parte de las autoridades competentes, está favoreciendo la comercialización actual de aceite de mayor calidad.

Por tanto, en esta **Memoria de Tesis Doctoral** hemos pretendido realizar un estudio bastante completo sobre la composición, valor nutricional y actividad antioxidante del aceite de argán virgen comercialmente disponible en nuestro país, seleccionando sólo muestras de calidad extra. En España el aceite de argán para uso alimentario sólo se comercializa en tiendas especializadas.

En paralelo se ha planteado un estudio comparativo con el aceite de oliva virgen (grasa dietética por excelencia) y otros 10 aceites vegetales comestibles: germen de trigo, soja, almendra, lino, nuez, pepita de calabaza, pepita de uva, sésamo, aguacate y girasol rico en oleico. Sólo los dos últimos han sido aceites refinados y el resto aceites de oliva vírgenes. En el aceite de oliva virgen, se eligió la variedad *Picual* por ser una de la más extendidas y rica en antioxidantes.

Para el análisis estadístico de los datos y a fin de establecer correctamente diferencias y similitudes entre los distintos aceites, se han aplicado técnicas

estadísticas avanzadas, como análisis discriminante multivariante y análisis factorial multivariante.

Los **resultados** derivados de la presente **Memoria** se han estructurado en 5 apartados o capítulos. El **CAPÍTULO 1** está centrado en el **control de calidad** de las muestras. Se comprobaron los principales criterios que recoge la Norma de calidad marroquí para aceite de argán categoría virgen extra, seleccionando únicamente aquellas muestras cuya calidad estuviera dentro de los límites establecidos. Asimismo, se comprobó la calidad del resto de aceites analizados conforme a la legislación vigente.

El **CAPÍTULO 2** se centra en el análisis comparativo del **perfil en ácidos grasos** del aceite de argán virgen extra y otros 11 aceites vegetales comestibles, mediante cromatografía de gases y análisis discriminante multivariante. El porcentaje medio de ácido oleico y ácido linoleico en los aceites de argán analizados ha sido de $45.6 \pm 1.60\%$ y $34.6 \pm 1.32\%$ respectivamente, con un porcentaje de ácidos grasos insaturados (mono- y poliinsaturados) que ronda el 80% del total de ácidos grasos. Los ácidos palmítico y esteárico son los más representativos en la fracción saturada, con un contenido medio del 12.7 y 5.83%, respectivamente. El modelo estadístico utilizado permite clasificar correctamente el 100% de las muestras analizadas y demuestra que, teniendo en cuenta la composición en ácidos grasos, el aceite de argán es muy similar al aceite de sésamo y al de girasol alto en oleico. Su similitud es menor con el aceite de oliva virgen aunque sí bastante más similar que lo son el resto de aceites incluidos en este estudio, salvo el aceite de aguacate.

El **CAPÍTULO 3** se dedica al estudio de antioxidantes (**polifenoles y tocoferoles**) y a la valoración de la **actividad antioxidante** del aceite. Se identifican y cuantifican mediante la técnica analítica HPLC-detector diodo-array, un total de 16 polifenoles en el aceite de argán, algunos de ellos descritos por primera vez. Cuantitativamente

destacan la quercetina, el ácido hidroxifenilacético y el hidroxitirosol con valores medios de 7.74, 5.29 y 3.73 mg/kg, respectivamente. El contenido total de polifenoles estimado por el método Folin-Ciocalteu muestra amplia variabilidad, con valores que oscilan entre 6.2-75.1 mg/kg (expresados en ácido gálico).

Los tocoferoles totales, analizados mediante HPLC-detector de fluorescencia, oscilan entre 384-511 mg/kg en aceite de argán, siendo este contenido 2.5 veces superior al de aceite de oliva pero bastante inferior al de los aceites de soja y germen de trigo. En el aceite de argán predomina la fracción γ -tocoferol (78% del total), mientras que en oliva, germen de trigo y almendra, es el α -tocoferol la fracción mayoritaria.

La aplicación de los modelos estadísticos a los datos obtenidos demuestra: **1.** Existe una correlación positiva directa entre actividad antioxidante del aceite (estimada por los ensayos DPPH, ABTS y FRAP) y el contenido total de polifenoles ($P<0.001$) y los contenidos en tirosol y oleuropeína ($P<0.001$); sin embargo, no se observa una correlación directa con el contenido total en tocoferoles. **2.** Los tocoferoles, especialmente la fracción γ -tocoferol, junto con los compuestos fenólicos pinosinol, oleuropeína, tirosol y luteolina son los parámetros de mayor peso en la discriminación y caracterización de los distintos aceites. **3.** En función del contenido en los antioxidantes analizados y la actividad antioxidante del aceite, se observa que el aceite de argán es muy similar al aceite de nuez, y en menor medida, a los aceites de lino y sésamo. **4.** Teniendo en cuenta los parámetros analizados, el aceite de aguacate es el más similar al aceite de oliva.

Se entiende por bioaccesibilidad la fracción de un compuesto disponible en el tracto gastro-intestinal para ser absorbido. Puesto que no existe información en bibliografía sobre la **bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos** del aceite de argán, el **CAPÍTULO 4** está dirigido a determinar dichos compuestos tras someter a las muestras a un proceso de digestión simulada, comparando con los resultados previos a la digestión. Se ha efectuado un estudio comparativo entre aceite de argán virgen extra, aceite de oliva virgen extra variedad Picual y aceite de soja virgen, seleccionando

al azar 4 muestras de cada uno de los aceites entre el total disponible. Como técnica analítica se ha utilizado UPLC-ESI-MS/MS que es una técnica puntera para este tipo de análisis dada su elevada sensibilidad y bajos límites de detección. Nuestro estudio ha permitido separar y cuantificar tras la digestión *in vitro*, 11 compuestos en aceite de argán, 7 en aceite de soja y 9 en aceite de oliva.

Los resultados obtenidos indican que: **1.** En los tres aceites ensayados, el contenido de los polifenoles identificados en los digeridos es menor que en los aceites de partida. Este hecho puede ser debido a la propia digestión intestinal (variación de pH, acción enzimática y biliar, etc.) que puede provocar cambios en la estructura molecular, apareciendo los correspondientes metabolitos. Para algunos polifenoles se produce una disminución superior al 80%, como es el caso de la vainillina, el ácido ferúlico o la luteolína. **2.** Sin embargo, tras la digestión se identifican compuestos que no aparecen inicialmente en los aceites; así, en los aceites de argán y oliva se detectan ácido cafeico y en aceite de soja ácido o-cumárico. Se observa en aceite de oliva y soja un ligero incremento de ácido gálico y o-cumárico en ambos, y en otros compuestos fenólicos para el aceite de soja. **3.** Este trabajo muestra, por primera vez, que muchos de los polifenoles del aceite de argán son estables durante el proceso de digestión, aunque solo una parte minoritaria de los mismos puede considerarse bioaccessible.

De todo lo expuesto, se deduce la necesidad de estudios adicionales que permitan valorar y describir mejor los complejos procesos a que se ven sometidos los compuestos fenólicos bajo las condiciones del tracto gastrointestinal.

Dado que el mantenimiento de la capacidad antioxidante de los aceites tras el proceso de digestión es requisito indispensable para ejercer una actividad *in vivo*, en el **CAPÍTULO 5** se evalúa la **biodisponibilidad de los polifenoles totales y de las propiedades antioxidantes** del aceite de argán mediante técnicas de digestión *in vitro* y ensayos con cultivos celulares, utilizando la línea celular Caco-2. Se analiza además, el **papel protector de la fracción bioaccessible frente a un estrés oxidativo inducido.**

En este caso, los ensayos se hacen de forma comparativa con muestras de aceite de oliva virgen extra. Los valores de actividad antioxidante (medida por los ensayos ABTS, DPPH y FRAP) son más altos en la fracción bioaccessible de los aceites que en los extractos químicos iniciales, aunque los datos del aceite de argán no superan en ningún caso a los del aceite de oliva. La combinación del proceso de digestión simulada con el estudio de la absorción a través de células de tipo intestinal, como las Caco-2, es un modelo idóneo para estudios de biodisponibilidad; utilizando tal modelo se comprueba que las propiedades antioxidantes del aceite de argán son altamente disponibles, de manera similar a las del aceite de oliva. Además, ambos aceites ejercen un papel protector parecido frente a una oxidación inducida a nivel celular, ya que neutralizan de manera significativa la apoptosis y la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por un agente pro-oxidante.

Consideramos que los datos aportados en esta memoria pueden ser muy útiles para valorar el valor dietético del aceite de argán y para una mejor interpretación de los hallazgos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* sobre las propiedades saludables de este peculiar aceite, un aceite emergente en el mercado internacional con un halo de “producto de lujo” pero consumido de forma ancestral en sus lugares de origen.



VII. CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en la presente Memoria de Tesis Doctoral, permiten inferir las siguientes conclusiones:

1. El perfil en ácidos grasos del aceite de argán es similar al de los aceites de sésamo y girasol alto en oleico y aunque se aproxima más que otros aceites al aceite de oliva, su contenido en ácido oleico es un 50% menor, marcando la principal diferencia entre ambos.
2. El aceite de argán virgen extra presenta elevada actividad antioxidante derivada principalmente, de su alto contenido en γ -tocoferol, compuesto que junto a determinados compuestos fenólicos, son los parámetros de mayor peso en la discriminación de los aceites analizados. En el aceite de oliva virgen el α -tocoferol es la fracción de tocoferoles mayoritaria, al igual que ocurre con los aceites vírgenes de germen de trigo y almendra. El contenido en polifenoles del aceite de argán es bastante inferior al del aceite de oliva pero superior al resto de los aceites analizados.
3. Los ensayos de digestión simulada han puesto de manifiesto que muchos de los polifenoles del aceite de argán son estables durante el proceso digestivo aunque sólo una porción minoritaria es bioaccesible. De manera similar se comportan los aceites de oliva y soja, detectándose además tras la digestión, compuestos no presentes inicialmente en los aceites. Este apartado merece estudios adicionales que abordaremos en el futuro a fin de profundizar en los metabolitos formados tras la digestión gastrointestinal del aceite.
4. La actividad antioxidante de la fracción bioaccesible del aceite de argán virgen extra es elevada aunque inferior a la del aceite de oliva. Además, dicha fracción ejerce un papel protector frente a una oxidación inducida por un agente prooxidante a nivel celular, similar a la ejercida por la fracción bioaccesible del aceite de oliva virgen extra. Ambas fracciones actúan neutralizando de manera significativa, la apoptosis y la generación de especies reactivas de oxígeno.

5. Los datos aportados pueden ser muy útiles para valorar el valor dietético del aceite de argán y para una mejor interpretación de los hallazgos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* sobre las propiedades saludables de este peculiar aceite, un aceite emergente en el mercado internacional con un halo de “producto de lujo” pero consumido de forma ancestral en sus lugares de origen.