



Effet des Polyphénols extraits des margines sur la stabilité de l'huile de tournesol (Effect of Polyphenols extracts from margins on the stability of sunflower oil)

S. Gharby^{1,2*}, H. Harhar¹, Z. Bouzoubaa³, A. Roudani², I. Chafchaoui⁴, B. Kartah¹, Z. Charrouf¹

¹ Laboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, BP 1014- Rabat, Morocco

² Etablissement Autonome de Contrôle et de coordination des exportations, Agadir, (Marocco) ;

³ INRA-CRRA Agadir- Unité de Recherche Ressources Naturelles et Produits de Terroir ; Laboratoire d'Agrophysiologie, B.P. 124, Inezgane, (Maroc)

⁴ Centre de recherche et formation doctorale universiapolis, BP 8143 Agadir, (Morocco).

Received 01 July 2013, Revised 25 Oct 2013, Accepted 25 Oct 2013

* Corresponding author. E mail s.gharby@yahoo.fr; Tel [06 70 26 69 65](tel:0670266965)

Abstract

In this study, polyphenols were extracted from margins in order to promote them as natural antioxidants and comparing it with a synthetic antioxidant Tert-butylhydroquinone (TBHQ). A concentration of 100 ppm of polyphenols or TBHQ was added to sunflower oil. To quickly assess the effect of polyphenols on the stability of the oil, we conducted an accelerated oxidation by Rancimat at 110 ° C under an air flow of 20 l / h. Then the oil was placed under storage conditions in an oven (accelerated test at 60 ° C) for 35 days. The evolution of the oxidation state was measured by the peroxide (IP), acidity and specific extinction at 270 nm. The results showed that the oils containing antioxidants have undergone oxidative damage less pronounced than that of the reference (no additives).

Keywords: Margins, polyphénols, antioxidants, vegetable oil, oxidation.

Résumé

Dans cette étude, les polyphénols ont été extraits des margines afin d'étudier leur possible valorisation en tant qu'antioxydants naturels. Leur activité a été comparée à celle d'un antioxydant synthétique : le tert-butylhydroquinone (TBHQ). Les polyphénols et le TBHQ ont été additionnés séparément à deux lots d'huile de tournesol, la stabilité de l'huile a été mesurée par oxydation accélérée (Rancimat à 110 °C, débit d'air de 20 l/h). Les lots d'huile ont été ensuite mis sous des conditions de stockage simulé (test accéléré à 60°C) pendant 35 jours. L'évolution de l'état d'oxydation a été mesurée par l'indice de peroxyde (IP), l'acidité, et l'extinction spécifique à 270 nm. Les résultats obtenus ont montré que les huiles traitées avec les antioxydants des extraits de margines ont subi une détérioration oxydative moins accentuée que celle du témoin (sans additifs).

Mots-clés : Margines, Polyphénols, Antioxydants, Huile végétale, Oxydation.

Introduction

L'industrie oléicole est une activité économique importante, concentrée principalement dans les pays méditerranéens qui tiennent environ 95% de la production mondiale [1]. En 2011, le Maroc produit 135.000 tonnes soit 4% de la production mondiale [1]. L'extraction de l'huile d'olive nécessite de grandes quantités d'eau, par conséquent cette industrie engendre d'importantes quantités d'effluents liquides : les margines. Ces dernières, ou eaux de végétation, sont des rejets très riches en matières organiques (composés phénoliques, lipides), parfois stockées provisoirement dans des cuves mais souvent lâchées dans la nature sur les sols agricoles, exposant ainsi le continuum eau-sol-plante-atmosphère à une pollution inéluctable. Vue l'importance des activités oléicoles dans le bassin méditerranéen, il se trouve ainsi confronté à une grave menace environnementale causée par les margines. Malgré leur profil polluant, les margines d'huile d'olive sont considérées comme une source très riche en antioxydants naturels : les polyphénols. De

plus, les polyphénols ont montré des propriétés antimicrobiennes, hypolipidémiques, hypocholestérolémiantes et anticancérigènes [2].

Les antioxydants phénoliques sont largement utilisés en agroalimentaire [3] car ils préviennent le développement d'arômes de rancidité aux conséquences technologiques très néfastes durant le stockage et la cuisson [4].

Parmi les antioxydants chimiques utilisés dans l'industrie alimentaire, la gamme des antioxydants phénoliques synthétiques tels que : le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), le tert-butylhydroquinone (TBHQ). Ce dernier est le plus utilisé par incorporation directe dans les huiles [5]. Le TBHQ est un antioxydant très commercialisé actuellement, il est de cinq à sept fois plus puissant que le BHA et le BHT. Il prolonge la durée d'utilisation du produit allant parfois jusqu'à deux fois [6]. Cependant, actuellement, le consommateur tend à éviter les additifs alimentaires synthétiques qui sont suspectés d'effets toxiques, sensibilisants, allergisants et cancérogènes [7]. Néanmoins, les antioxydants naturels sont recherchés [8]. De ce fait, l'industrie agroalimentaire développe l'utilisation des antioxydants naturels. A l'heure actuelle, les polyphénols capturent l'intérêt des chercheurs afin de trouver de nouvelles matières premières abondamment disponibles [9]. Une tentative de récupérer des polyphénols des margines aurait en plus de la sécurité du consommateur, un double intérêt: d'une part, résoudre un problème environnemental majeur et d'une autre part, valoriser les polyphénols pour des applications ultérieures en agroalimentaire, en cosmétique ou en pharmacologie. Le présent travail a pour objectif de vérifier la stabilité de l'huile de tournesol afin de valoriser les polyphénols extraits des margines.

2. Matériels & Méthodes

2.1. Matières premières utilisées

La margine utilisée dans notre étude a été obtenue à partir des olives de la variété picholine, pressées dans une huilerie semi-automatique par le processus d'extraction en 2012; pression puis centrifugation. L'huile raffinée de tournesol a été fournie par la société Lesieur-cristal (Casablanca-Maroc).

2.2. Extraction des polyphénols de la margine

La margine est delipidée par une extraction totale à l'hexane. Les polyphénols sont extraits de la margine delipidée par l'acétate d'éthyle (V/V). Le mélange est agité puis décanté, cette opération est répétée quatre fois dans le but de récupérer le maximum de composés phénoliques. Une séparation en deux phases permet d'aspirer le surnageant composé d'acétate d'éthyle riche en Poly phénols.

2.3. Préparation des huiles

Nous avons préparé trois types d'huiles préparées à partir d'un même lot de l'huile de tournesol, chaque type a été en double exemplaires: 1) l'huile de tournesol témoin, 2) l'huile de tournesol enrichie par 100 ppm de TBHQ (purchased from Professional Labo (Casablanca, Morocco)), et 3) l'huile de tournesol enrichie par 100 ppm de polyphénols.

2.4. Méthodes analytiques:

L'acidité libre, exprimée en pourcentage d'acide oléique et l'indice de peroxyde (IP), ont été mesurés selon des méthodes normalisées successivement ISO 660, ISO 3960. Le degré de rancissement a été déterminé par Rancimat (743 METROHM) selon la norme ISO 6886. Les conditions opératoires ont été les suivantes: une prise d'essai d'huile de 3g, un débit d'air de 20 L/h et une température de 110 °C. La détermination de la composition en acide gras totaux des huiles a été réalisée en préparant les esters méthyliques selon la norme internationale ISO 5509. Ces esters ont été ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) à l'aide d'une chromatographie VARIAN selon la méthode ISO 5508 à détecteur à ionisation de flamme (FID), équipé d'une colonne capillaire (CPWAX) de 30 m de longueur et de 0.25 mm de diamètre intérieur. La température du four est réglée à 200°C, celle de l'injecteur à 220 °C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à 1.2 ML/min et le volume de l'injection est de 1 µl.

2.5. Étude statistique

Les résultats ont été traités par le logiciel Costat CoHort softwar, l'analyse de variance à un, ou 2 critères de variation, la comparaison de moyenne selon le test de Student-Newman et Keuls est au seuil de 0.05 ; le dispositif expérimental est un bloc aléatoire complet à deux répétitions.

3. Résultats & Discussion

3.1. La stabilité oxydative initiale par test Rancimat

Pour estimer l'oxydation initiale des différentes huiles étudiées, nous avons mesuré la résistance de l'huile à l'oxydation accélérée par Rancimat à 110 °C qui représente le temps de résistance de l'huile à l'oxydation accélérée [10]. L'huile de tournesol témoin présente la période d'induction à 110°C la plus faible 5.5h (Tableau-1). Cependant, l'huile enrichie par les polyphénols a enregistré une période un peu longue par rapport à l'huile

de tournesol témoin qui est de l'ordre de 2h et de 0.5 h de plus que le tournesol avec TBHQ (Tableau 1). Bien qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différents traitements, ces résultats, montrent que les polyphénols augmentent la stabilité des huiles végétales. En effet selon la littérature les polyphénols jouent un rôle important dans l'activité antioxydante de l'huile comme piègeur de l'oxygène actif [11].

Tableau 1 : Rancimat à 110°C des huiles de tournesol avec les trois traitements

	Tournesol témoin	Tournesol+ Polyphénols	Tournesol +TBHQ
Rancimat [h]	5.5 ± 0,56 ^a	7.5 ± 0.84 ^a	7 ± 0,49 ^a

Les valeurs de la même ligne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 0.05.

3.2. Étude de la stabilité au cours du stockage à 60°C

Suite aux résultats avantageux obtenus par le test Rancimat, nous avons mené une deuxième étude à 60°C afin de confirmer l'effet des polyphénols sur la stabilité de l'huile de tournesol. Ces trois huiles sont stockées à 60 °C pendant 35 jours. L'évolution de l'état d'oxydation est mesurée par l'acidité, l'indice de peroxyde, E270 et la composition en acide gras.

3.2.1. Le degré d'altération: Acidité

L'acidité libre, est un facteur important pour évaluer la qualité d'une huile, et elle est largement utilisée à la fois comme un critère classique de classification commerciale des huiles vierges (huile d'olive et huile d'argane) [12]. C'est aussi un facteur qui renseigne sur l'altération de l'huile par hydrolyse [12]. En effet, dans les huiles végétales, les acides gras naturels sont essentiellement présents sous forme de triglycérides 98-99% [13]. L'hydrolyse de ces derniers libère des acides gras dont le dosage permet d'avoir une idée sur l'état d'avancement de la dégradation de l'huile [12]. En général les huiles raffinées renferment naturellement très peu d'acides gras libres [13]. Les résultats obtenus (Tableau 2), ont montré des différences peu à hautement significatives entre le début et la fin de l'expérience, qui se sont traduites par une légère variation de l'acidité pour toutes les huiles (tableau 2). Après 35 jours de stockage à 60 °C, l'acidité de l'huile tournesol témoin est passée de 0,08 % à 0,11 %, pour l'huile de tournesol enrichie par les polyphénols, elle est passée 0,06 % à 0,09 % et de 0,06 % à 0,1 % pour l'huile de tournesol enrichie par TBHQ. La faible évolution de l'acidité au cours du stockage peut s'expliquer par l'hydrolyse des triglycérides qui n'est pas suffisante pour compenser, voire augmenter les fonctions acides gras libres bloquées par polymérisation ou volatilisées au cours de phase d'oxydation [14].

Tableau 2. Comparaison des moyennes de l'acidité obtenues au cours du stockage à 60°C avec les trois traitements ; (Tsol+TBHQ), (Tsol+Polyphénol), (T.sol).

	Acidité [%]			
	Jours	Tsol+ TBHQ	Tsol+Polyphénols	T sol
T= 60°C Bouteilles Transparentes	0	0.05±0.007 ^a	0.055±0.007 ^a	0.075±0.007 ^a
	7	0.065±0.007 ^{ab}	0.055±0.007 ^a	0.085±0.007 ^{ab}
	14	0.075±0.007 ^{ab}	0.085±0.007 ^b	0.095±0.007 ^{ab}
	21	0.085±0.007 ^b	0.095±0.007 ^b	0.095±0.007 ^{ab}
	28	0.095±0.007 ^b	0.095±0.007 ^b	0.11±0.014 ^b
	35	0.090±0.014 ^b	0.085±0.007 ^b	0.105±0.007 ^{ab}
F		6.33	13.86	4.37
P		0.019*	0.003**	0.052ns
LSD_{0.05}		0.020	0.017	0.021

Les valeurs de la même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 0.05. (*, différences peu significatives ; **, différences significatives et ns, pas de différences significatives)

3.2.1. L'indice de peroxyde

Pour la commercialisation d'une huile végétale, sa durée de vie est essentielle pour déterminer un écart de temps séparant la production et la consommation [1]. Pour protéger le consommateur, la législation exige, plusieurs paramètres pouvant décrire l'état d'oxydation d'une huile. En effet, l'indice de peroxyde est l'un de ces paramètres, cet indice augmente progressivement avec l'oxydation primaire de l'huile jusqu'à ce que le taux de dégradation des hydroperoxydes formés dépasse la formation de nouveaux hydroperoxydes [15-16]. Pour les

huiles raffinées, la norme européenne fixe la valeur maximale de cet indice à 10 Méq O₂/Kg d'huile [17]. L'huile de tournesol témoin signale une augmentation nettement plus rapide de l'indice de peroxyde lors du stockage par rapport aux autres huiles (Tableau-3). En effet, l'huile de tournesol sans additifs (témoin) présente le plus haut indice de peroxyde parmi les autres huiles. En fait, son indice de peroxyde était de 2,5 Méq O₂/kg avant d'être soumis à la température de l'étuve (60 °C) et après 35 jours de stockage, il atteint 39,4 MéqO₂/kg. Une augmentation très accentuée (16 fois) de son indice de peroxyde initial peut être constatée à la fin du stockage. L'évolution de cet indice des huiles contenant des antioxydants suit relativement un rythme moins accentué que celle du témoin. Ceci démontre que l'enrichissement de l'huile végétale par les polyphénols semble améliorer la stabilité oxydative de l'huile raffinée comme le prouve le test Rancimat que nous avons évoqué dans la première partie, cette même explication a été avancée par d'autres études confirmant que les polyphénols augmentent la stabilité des huiles[18].

Tableau 3. Comparaison des moyennes de l'Indice de peroxyde obtenues au cours du stockage à 60°C avec les trois traitements ; (Tsol+TBHQ), (Tsol+Polyphénol),(T.sol).

	Indice de peroxyde			
	Jours	Tsol+ TBHQ	Tsol+Polyphénols	T sol
T= 60°C Bouteilles Transparentes	0	2,15±0,21 ^a	1.8±0.14 ^a	2.47±0.53 ^a
	7	2.90±0.28 ^a	2.25±0.35 ^a	5.5±0.56 ^a
	14	3.10±0.63 ^a	2.50±0.70 ^a	13.5±2.82 ^b
	21	7.50±1.83 ^b	8.40±0.98 ^b	18.75±3.53 ^b
	28	12.62±2.00 ^c	11.85±1.06 ^c	26.25±3.89 ^c
	35	18.25±0.77 ^d	21.56±1.64 ^d	39.37±2.79 ^d
F		59,11	132.58	51.30
P		0.0001***	0.000***	0.0001***
LSD_{0.05}		2,92	2,33	6,63

Les valeurs

de la même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 0.05.(*,différences peu significatives ; **, différences significatives et*** différences très hautement significatives)

3.2.3. L'absorption E 270

Après la formation des hydro peroxydes dans les premières étapes de l'oxydation qui sont des produits instables, ils se transforment rapidement en des produits secondaires d'oxydation en particulier dicétones et cétones insaturées qui absorbent la lumière au voisinage de 270nm [19]. L'absorption spécifique à 270nm (K270) est donc un marqueur pour de la formation des produits secondaires d'oxydation [20]. Ainsi, on peut dire que l'indice de peroxyde et l'absorption spécifique à E270 sont une image de l'état d'oxydation d'une huile. Plus la valeur de l'indice de peroxyde est forte, plus l'huile est peroxydée et plus celle à E270 est forte, plus l'huile est riche en produits secondaires d'oxydation [19-21]. D'après les résultats présentés en Figure-3, toutes les huiles présentent des valeurs initiales de l'absorption E 270 très élevées, ceci est dû au raffinage qui augmente l'absorption à 270 nm. La formation des produits secondaires d'oxydation (analysés par l'absorption E270) a subi une légère augmentation durant toute la période de stockage à 60°C pour toutes les huiles étudiées. Après 35 jours de stockage, l'huile de tournesol enrichie par les polyphénols a atteint la valeur de l'absorption E270 de 2,9, l'huile de tournesol enrichie par TBHQ de 2,93. L'évolution la plus intense a été enregistrée dans l'huile de tournesol témoin, qui est passée de 2,14 à 3,1. Finalement, on peut dire que le taux de formation des produits secondaires d'oxydation n'a pas significativement changé entre les trois huiles étudiées (Figure-3), ceci suggère que les polyphénols n'interviennent pas dans la phase secondaire d'oxydation (la dégradation des hydroperoxydes), ou bien qu'ils ont intervenu de la même façon que pour le TBHQ, car les résultats diffèrent par rapport au témoin qui lui, est passé de 2,14 à 3,1).

En général, les résultats obtenus ne montrent pas de grandes différences entre le Tsol+TBHQ et le Tsol+Polyphénols pour les trois paramètres étudiés 7,75 et 8,06 pour l'IP par exemple , avec un écart moyen d'au moins 6,24 (tableau 5); La même chose a été observée pour l'acidité et le E 270 ; par contre les 3 paramètres montrent des valeurs très différentes quand il s'agit de les comparer avec le TSoL, en effet alors que ce dernier donne une valeur de 17, 64 pour l'IP, la moyenne des deux autres traitements ne dépassait pas 8, 04 (pour le Tsol+polyphénols), et selon les écarts types les différences sont hautement significatives avec le Tso+TBHQ et le T+polyphénols d'une part et le Tsol d'autre part (Tableau 5). Les différences entre les maximas et les minimas des

paramètres étudiés sont plus importantes chez le témoin Tsol que chez les deux autres traitements, ce qui veut dire que l'huile témoin a subi une dégradation plus importante que les deux autres traitements (Tableau 5).

Tableau 4 : Comparaison des moyennes de l'extinction E270 obtenues au cours du stockage à 60°C avec les trois traitements ; (Tsol+TBHQ), (Tsol+Polyphénols), (T.sol).

	Extinction E270			
	Jours	Tsol+ TBHQ	Tsol+Polyphénols	T sol
T= 60°C Bouteilles Transparentes	0	2.35±0.07 ^a	2.26±0.021 ^a	2.14±0.33 ^a
	7	2.48±0.028 ^b	2.34±0.028 ^b	2.36±0.028 ^{ab}
	14	2.54±0.056 ^{bc}	2.62±0.014 ^c	2.50±0.028 ^{ab}
	21	2.64±0.014 ^c	2.73±0.014 ^d	2.83±0.014 ^{bc}
	28	2.89±0.028 ^d	2.94±0.056 ^c	2.42±0.367 ^{ab}
	35	2.91±0.021 ^d	2.90±0.056 ^c	3.05±0.141 ^c
F		59.18	188.18	8.39
P		0.0001***	0.0000***	0.0111*
LSD_{0.05}		0.102	0.070	0.39

Les valeurs de la même colonne suivies des mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 0.05. (*, différences peu significatives ; **, différences significatives et *** différences très hautement significatives)

Tableau 5. Moyennes obtenues des différents paramètres mesurés à différents traitements tout temps confondus avec écarts standards (ES) et valeurs limites (minimum (Min) et maximum (Max))

Paramètres dosés	Tsol+ TBHQ			Tsol+Polyphénols			T sol		
	Moy±ES	Min	Max	Moy±ES	Min	Max	Moy ±ES	Min	Max
IP	7.75±6.24	2	18.8	8.06±7.42	1.7	22.72	17.64±13.24	2.1	41.35
Acidité	0.077±0.016	0.05	0.1	0.078±0.018	0.05	0.1	0.094±0.013	0.07	0.12
E270	2.63±0.21	2.3	2.93	2.63±0.26	2.25	2.93	2.55±0.33	2.12	3.15

3.2.5. Les acides gras

La composition chimique en acide gras d'une huile peut être un indicateur de sa stabilité, ses propriétés physiques et sa valeur nutritionnelle [22-23]. Le tableau-2 regroupe les résultats de la dégradation des acides gras durant toute la période de stockage. Le stockage pendant 35 jours de stockage à 60 °C n'a pas une grande influence sur la composition en acides gras de toutes les huiles étudiées. De légers changements dans la composition des acides gras dans les huiles de tournesol témoin ont été détectés. Peu de changements ont été observés pour l'acide gras insaturé de type linoléique C18:3. Ce dernier est diminué de 0,2% durant la période de stockage allant de 0,3% à 0,1% la même constatation a été observée pour la même huile sur l'acide linoléique C18:2 ce dernier est passé de 64.5% à 62.7%, mais ces diminutions restent acceptables, car toutes les huiles y compris le témoin sont toujours dans les normes codex après 35 jours de stockage à 60°C. Ainsi, on peut conclure que l'oxydation pendant 35 jours de stockage à 60 °C n'a pas d'influence sur la composition des acides gras contenus dans les différentes huiles, comme c'est montré dans le Tableau 6.

Tableau 6. La dégradation des acides gras en fonction de la période de stockage.

	Tournesol témoin		Tournesol+ Polyphénols		Tournesol +TBHQ	
	Initiale	Finale	Initiale	Finale	Initiale	Finale
C16:0	6.7±0.1	6.8±0.1	6.9±0.1	6.5±0.1	6.3±0.1	6.5±0.1
C18:0	4.5±0.1	4.1±0.1	4.3±0.1	3.7±0.1	4.3±0.1	3.7±0.1
C18:1	23.8±0.1	24.2±0.1	23.6±0.1	24.8±0.1	24.2±0.1	34.8±0.1
C18:2	64.5±0.1	62.7±0.1	64.6±0.1	63.6±0.1	64.3±0.1	53.6±0.1
C18:3	0.3±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1	0.3±0.1	0.1±0.1
SAGS	11.2±0.1	10.9±0.2	11.2±0.2	10.2±0.2	10.6±0.1	11.2±0.1
SAGINS	88.6±0.5	87.2±0.3	88.4±0.5	88.5±0.2	88.8±0.5	88.5±0.5

Conclusion

D'après notre étude, il paraît clairement que les polyphénols extraits des margines sont des antioxydants efficaces qui présentent deux avantages importants. D'une part, ces polyphénols d'origine naturelle qui sont caractérisés par une haute capacité antioxydante comparable au TBHQ qui lui, est synthétique ; et peuvent le remplacer en agroalimentaire selon une utilisation rationnelle qui n'implique pas de risques sur la santé humaine et de plus est de moindre frais. D'autre part, l'impact environnemental des margines a été réduit ce qui mènerait les pays producteurs d'huile d'olive à profiter de cette matière première à l'échelle industrielle en tant que source économiquement non chère, mais riche en polyphénols. En effet, au cours d'un stockage de 35 jours à l'étuve (60 °C), l'huile de tournesol a acquis une meilleure résistance à l'oxydation suite à un ajout de 100 ppm des polyphénols. Pour la suite de l'étude, il serait intéressant de reconduire ces essais, et d'évaluer aussi de comparer, l'effet antioxydant des polyphénols extraits des margines dans d'autres huiles végétales sous des conditions de stockage normales de commercialisation des huiles végétales ensuite les comparant à d'autres antioxydants naturels (tocophérols) et d'étudier leur effet synergique au cours de l'oxydation.

Références

1. Gharby S., Harhar H., Kartah B., Chafchaoui I, Sibawayh Z., Charrouf Z. *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (2013) 935.
2. Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri F. *J. Agr. Food Chem.*, 49 (2001) 3509.
3. Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F., Galli, C. *J. Agr. Food Chem.*, 47 (1999) 3397.
4. Gharby S., Harhar H., Guillaume D., Haddad A., Charrouf Z. *Nat. Prod. Com.* 7 (2012) 621-624.
5. Van Aardt M., Duncan S., Long T., O'Keefe S., Marcy J. and Sims S. *J. Agr. Food Chem.*, 52 (2004) 587-591.
6. Lolos M., Oreopoulou, V. and Tzia, C. *Journal of the Science. Food and Agriculture*, 79 (1999)1524-1528.
7. Farag R., El-Baroty G. and Basuny, A. *Internat. Journal of Food Science and Technology*, 38 (2003) 81-87.
8. Bianco A. et Uccella N. Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33 (2000) 475-485.
9. Brenes M., Garcia A., Dobarganes C., Velasco J. et Romero C. *J. Agr. Food Chem.*, 50 (2002) 5962-5967.
10. Gharby S., Harhar H., Kartah B., Guillaume D. and Charrouf Z. *Nat. Prod. Com.* 8 (2013) 29-31.
11. Chimi H., Rahmani M., Cillard J., Cillard P. *Rev Fr Corps Gras* 37 (1990) 363-367.
12. Gharby S., Harhar H., Kartah B., El Monfalouti H., Haddad H., Charrouf Z. *Les Technologies des Laboratoires* 22(2011) 13-23.
13. Lecerf, J.-M. *Médecine des maladies Métaboliques* 3(2011) 257-262.
14. Richardson T. & Finley J. W. Westport, Connecticut: *AVI Publishing Company, INC* (1985) – 205-217.
15. Marmesat S., Morales A., Velasco J., Ruiz-Méndez M.V., Dobarganes M. C. *Grasas y Aceites*, 60 (2009) 155.
16. Gharby S., Harhar H., Guillaume D., Haddad A., Matthäus B., Charrouf Z. *LWT Food Sci. Techn.*, 44 (2011) 1.
17. CODEX Alimentarius Commission. Stan 33, 1981, revised 2 (2003).
18. Maurizio Servili, Gianfrancesco Montedoro *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104 (2002) 602–613.
19. Gharby, S., Harhar, H., El Monfalouti, H., Kartah, B.E., Maata, N., Guillaume, D., Charrouf, Z., *Med. J. Nutr. Metab.* 5 (2012) 31–38
20. Harhar H., Gharby S., Guillaume D., Charrouf Z. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 915-920.
21. Gutiérrez F., Villafranca M. J., and Castellano J. M. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (79) 7 (2002) 669-676.
22. Harhar H., Gharby S., Kartah B.E., El Monfalouti H., Charrouf Z., Guillaume D., *Nat. Prod. Com.* 5 (2010) 1799.
23. Gharby S., Harhar H., Roudani A., Chafchaoui I.; Charrouf Z. *Int. J. Pharm. Sci. Invention* (2), 5 (2013) 41.

(2014), www.jmaterenvironsci.com