



Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y BIOCENCIAS**  
**NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA  
BIOZIENTZIETAKO GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA**

*CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES  
MEDIANTE HPLC*

presentado por

*Nerea Camino Pérez*

**GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS**  
**GRADUA ELIKAGAI PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAN**

Mayo, 2021



## Resumen

Cada aceite es una mezcla compleja de triacilglicéridos, cuyas diferencias radican principalmente en las posiciones de los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol, en la longitud de las cadenas de carbono y en el número y posiciones de los dobles enlaces presentes en las moléculas. Para la identificación de los triacilglicéridos presentes en distintas muestras de aceite, se hace uso de un método de cromatografía líquida de alta resolución con un detector UV (HPLC-UV) y del cálculo del número equivalente de carbonos (ECN) para cada molécula. Además, se estudia la probabilidad teórica de aparición de cada triglicérido formado a partir de la combinación de los ácidos grasos mayoritarios presentes en el aceite, para diferenciar las señales correspondientes a los triglicéridos que presentan el mismo número equivalente de carbonos. De esta manera, se logra la identificación de los distintos triglicéridos presentes en ocho tipos de aceites vegetales diferentes (oliva, girasol, soja, maíz, aguacate, cacahuete, palma y sésamo). También se propone una aplicación del método de caracterización de aceites vegetales desarrollado en este trabajo en la industria alimentaria, mediante el análisis del aceite utilizado como líquido de cobertura de conservas de atún y sardinas en aceite.

*Palabras clave:* Aceites vegetales, Cromatografía, HPLC, Triacilglicérido

## Abstract

Each oil is a triacylglycerides complex mixture, whose differences lie mainly in the positions of the fatty acids in the glycerol backbone, in the carbon chains length and in the number and positions of the double bonds present in the molecules. For the triacylglycerides identification, a high-performance liquid chromatography method equipped with a UV detector (HPLC-UV) and the calculation of the equivalent number of carbons (ECN) has been used. Moreover, the theoretical probability of occurrence of each triglyceride formed by the combination of the major fatty acids present in the oil has as well been studied, in order to differentiate the signals corresponding to triglycerides having the same equivalent number of carbons. Therefore, the identification of the different triglycerides present in eight different types of vegetable oils (olive, sunflower, soybean, corn, avocado, peanut, palm and sesame) is attained. A proposal for the application of the vegetable oil characterisation method developed in this work in the food industry is also included, through the analysis the oil used as a covering liquid for canned tuna and sardines in oil.

*Keywords:* Vegetable oils, Chromatography, HPLC, Triacylglyceride



## Índice

1. Introducción .....	1
1.1. Interés de los aceites.....	1
1.2. Aceites y grasas vegetales .....	3
1.3. Caracterización de aceites .....	6
1.3.1. Evaluación sensorial.....	6
1.3.2. Métodos de análisis fisicoquímicos.....	7
1.3.3. Métodos de análisis instrumentales .....	8
1.4. HPLC.....	9
2. Objetivos .....	13
3. Materiales y métodos .....	14
3.1. Reactivos líquidos y sólidos .....	14
3.2. Equipo utilizado .....	15
3.3. Procedimiento de análisis.....	15
3.3.1. Condiciones del análisis.....	16
4. Resultados y discusión .....	17
4.1. Estructuras moleculares y cálculo del ECN .....	17
4.2. Cálculo teórico de probabilidades de aparición de los TGs .....	19
4.3. Cromatogramas y probabilidades.....	21
4.4. Aplicación en la industria alimentaria.....	30
5. Conclusiones .....	32
6. Bibliografía .....	34
7. Anexos.....	40



## 1. Introducción

El interés por lo natural, lo ecológico u orgánico ha impulsado a las industrias agroalimentarias a volver a los alimentos “tradicionales”. En la actualidad, un elevado porcentaje de los consumidores demandan alimentos y bebidas con más propiedades saludables, menos ingredientes artificiales y reconocibles para ellos, además de querer conocer su origen o procesado.

En este sentido, la grasa ha dejado de estar estigmatizada y los consumidores son conscientes de que existen “grasas malas” y “grasas buenas” cuyo uso debe priorizarse, como es el caso del aceite de oliva (Murcia, 2016).

Las grasas y los aceites además tienen múltiples propiedades industriales de aplicación en productos alimentarios, como pueden ser la aireación, texturización, cocción y conservación de los alimentos, contribuyendo a la palatabilidad de los mismos, mejorando sus características organolépticas y su apariencia (Cabezas-Zábala et al., 2016). Estas propiedades condicionan que las grasas y los aceites se utilicen ampliamente para la elaboración de productos de panadería y bollería, así como líquido de cobertura en la elaboración de alimentos en conserva, entre otros múltiples usos.

En un estudio realizado por la Asociación de Industrias de Alimentación de Aragón y el Cluster de Alimentación de Aragón se recoge que, dos de cada tres consumidores leen siempre la información nutricional de los alimentos, y que se prefieren alimentos con menos aditivos y con más fibra y calcio. Además, en colaboración con el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, y en el marco de un proyecto PDR 2014-2020, se ha realizado una encuesta a más de 400 consumidores, principalmente de Aragón, para conocer hábitos de consumo y su percepción sobre los alimentos con propiedades saludables, resultando una de las principales conclusiones que el 40% de los productos analizados requieren mejorar su información nutricional en el etiquetado (Lopez, 2017).

### 1.1. Interés de los aceites

La demanda de aceites y grasas en España se caracteriza por el alto consumo de aceites vegetales y por el bajo nivel que alcanzan otras grasas comestibles (Parras-Rosa, 2001). Estas grasas y aceites pueden servir como fuente de energía a la mayoría de las células del organismo, excepto a las del sistema nervioso y los glóbulos rojos. Dependiendo de las necesidades energéticas, pueden ser utilizadas de manera inmediata o almacenarse en el tejido adiposo en forma de triacilglicéridos (TGs) como fuente de energía a largo plazo (Cabezas-Zábala et al., 2016).

Es importante moderar el consumo de grasa total y, fundamentalmente, de grasa saturada, procedente principalmente de alimentos de origen animal y aumentar el consumo de aceites vegetales, como el aceite de oliva, suministradores de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) y ácidos grasos monoinsaturados (AGM) (Azcona, 2013).

El rango de ingesta deseable de AGM, debe situarse entre el 12-30% del total de la energía de la dieta diaria (27-65 g/d). En base a los datos del estudio PREDIMED, la ingesta deseable de AGM para la población española se encuentra entre el 20-25% de la energía diaria (45-55 g/d) y la fuente principal debe ser el aceite de oliva virgen (Ros, s. f.). Por otro lado, el consumo de ácidos

grasos insaturados también se relaciona con efectos beneficiosos para la salud, como por ejemplo, una relación entre el consumo de AGP y la reducción de niveles de colesterol (Carrillo Fernández et al., 2011).

Según un estudio de segmentación de mercado de consumo español de aceites y grasas, en la actualidad se consumen 215 millones de toneladas de aceites y grasas en el planeta. En concreto, en España se solicitan algo menos de 1,2 millones de toneladas, lo que supone un 0,55% del total de la demanda mundial (Vilar, 2020).

De acuerdo con el Informe del Consumo Alimentario en España en 2019, en los hogares españoles el aceite más consumido se corresponde con el tipo Oliva, obteniéndose una cuota en volumen del 66,3% del total, en la suma de los tres tipos de aceite de oliva más habituales (aceite de oliva, aceite de oliva virgen y aceite de oliva virgen extra). En concreto, a lo largo del 2019 el aceite de oliva es el que más se consumió, alcanzando un 34,4% del volumen total del aceite consumido (MAPAMA, 2020).

En la Figura 1, se puede apreciar que dos de los tres tipos de aceites de oliva (aceite de oliva virgen extra y aceite de oliva) han experimentado una subida en su volumen de consumo anual. En cambio, el resto de aceites han disminuido su cuota del mercado, siendo el consumo de aceite de oliva virgen el que más ha disminuido respecto al año anterior (-43,2%). A la vista de estos valores se puede observar que más de la mitad de los aceites y grasas consumidos en España se corresponden con aceites de origen vegetal y en concreto con aceites de oliva.

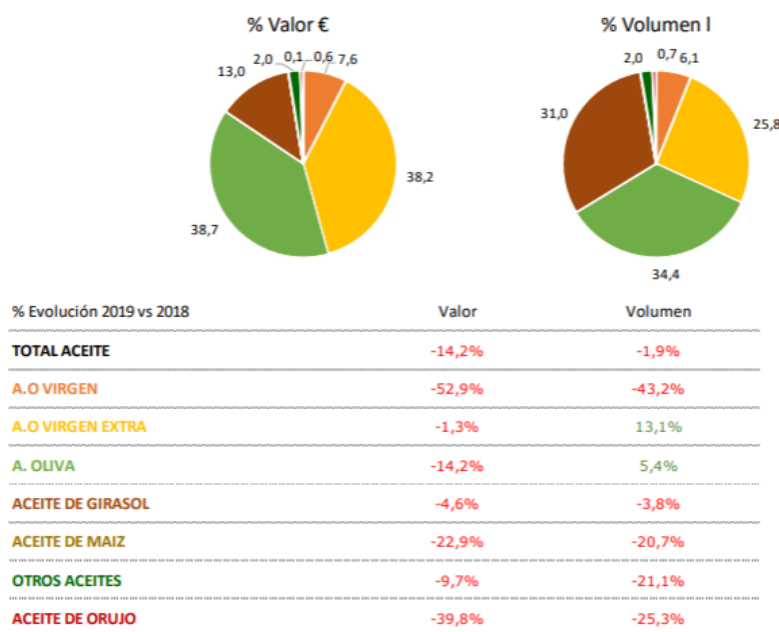


Figura 1. Distribución sectorial de los distintos tipos de aceites (MAPAMA, 2020).

Los factores más influyentes a la hora de comprar aceite para el consumo humano son, por orden de importancia, el sabor y los efectos positivos para la salud. A continuación, y diferenciándose poco entre sí, se sitúan los factores del precio, la costumbre y tradición. Atendiendo a los factores comentados anteriormente podemos clasificar los aceites en dos grupos según sus usos: los destinados a “freír” y otros usos. Así, si bien el sabor es el principal motivo de compra para todos los usos, incrementa su importancia relativa en los usos del aceite en «crudo», siendo menos



importante en el uso «freír», en el cual los aspectos económicos, fundamentalmente precio y buen rendimiento, son considerados en mayor medida en comparación con el resto de los usos (Parras-Rosa, 2001).

## 1.2. Aceites y grasas vegetales

Las grasas vegetales se clasifican de forma general en dos grandes grupos: las procedentes de frutos y las obtenidas a partir de semillas oleaginosas. Podemos encontrar tanto grasas líquidas a temperatura ambiente como otras que son sólidas, siendo este el caso del aceite de palma o de coco, entre otros.

Entre las distintas variedades de aceite o grasa vegetal, destacan por su frecuencia de uso los siguientes:

- Aceite de oliva

Se obtiene de la pulpa y el hueso de las aceitunas que crecen mayoritariamente en la zona mediterránea. Contiene más de un 80% de ácido oleico. El aceite procedente de la pulpa no presenta diferencias con respecto al aceite obtenido del hueso de la aceituna (Baltes, 2006).

- Aceite de girasol

Es la grasa procedente de la semilla del girasol (*Helianthus annuus*). El contenido de lípidos es muy elevado siendo muy cercano al 100%, encontrándose la mayor parte de estos como TGs. La composición mayoritaria en este aceite se corresponde con ácidos grasos poliinsaturados (62%), entre los que destaca el ácido linoleico (Federación Española de la Nutrición, s. f.).

- Aceite de soja

Constituye en la actualidad uno de los componentes principales de la margarina. Además de un 35% de proteínas, el haba de soja contiene un 2-4% de lecitina y un 13-26% de grasa, con contenidos de ácido linoleico que pueden ser superiores al 50% (Baltes, 2006).

- Aceite de maíz

Se extrae de las semillas de la planta *Zea mays*. Este aceite está compuesto principalmente por ácido linoleico (61,9%), ácido oleico (24,1%), ácido palmítico (11%) y en menor medida ácido esteárico y ácido linolénico (Delucchi et al., 2019).

- Aceite de aguacate

Se caracteriza por contener una baja proporción de ácidos grasos saturados (entre un 10 y 19%, dependiendo de la variedad y el estado de madurez), una elevada cantidad de ácido oleico (puede llegar hasta un 80%), un nivel aceptable de ácidos grasos poliinsaturados (11-15%) y cantidades mínimas de colesterol (Pérez Rosales et al., 2005).

- Aceite de cacahuete

Es un aceite ligeramente amarillo y con un olor suave. Constituye una de las mejores materias primas para la producción de margarina. Contiene más de un 80% de ácidos grasos insaturados, de los cuales hasta un 35% puede ser ácido linoleico. Resulta característico de este aceite la presencia de los ácidos araquídico, behénico y lignocérico, hecho que se utiliza en la identificación analítica del aceite de cacahuete. Los cacahuetes contienen entre un 25% y un 50% de grasa, siendo este porcentaje más elevado cuanto más cálido sea el lugar de cultivo (Baltes, 2006).

- Aceite de palma

Se elabora a partir de los frutos de la palmera *Elaeis guineensis*, que crece en países tropicales (Congo, Indonesia). Son de color rojo, parecidos a las aceitunas y catalogados como frutos, y contienen entre un 30-70% de aceite. Dado que se conservan durante poco tiempo, el aceite ya se elabora en el país de cultivo. El aceite de palma crudo presenta un aspecto parecido a la manteca de cerdo, aunque un color amarillo oscuro a causa de su alto contenido de caroteno. Actualmente, esta grasa alimentaría está muy demandada para la producción de margarina (Baltes, 2006). Este aceite posee ácidos grasos insaturados como el oleico (36-44%) y el linoleico (9-12%); y ácidos grasos saturados como palmítico (39,3-47,5%) y esteárico (3,5-6%) (Rincón & Martínez, 2009).

- Aceite de sésamo o aceite de ajonjolí

Se extrae a partir de las semillas de *Sesamum Indicum L.*, que poseen un contenido promedio de 50% de aceite y 25% de proteína. El aceite que se obtiene contiene aproximadamente 47% de ácido oleico y 39% de ácido linoleico (Cortez Cortez & Sánchez Carbajal, 2017).

Las grasas vegetales comestibles están formadas fundamentalmente por mezclas complejas de triacilglicéridos, además de otros componentes, en un porcentaje menor, como lípidos saponificables complejos (fosfolípidos) y lípidos no saponificables (terpenos, esteroides, vitaminas, etc.). Los TGs son moléculas de glicerol esterificadas por tres AGs, que difieren en la longitud de la cadena acilo, el número y las posiciones de los dobles enlaces (Holčapek et al., 2005). Cada aceite es único en cuanto a su composición en TGs y AGs (como se puede observar en la Tabla 1; Anexo 1).

Los ácidos grasos, como el oleico (O), el linoleico (L), palmítico (P), etc., se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de la cadena carbonada, el número, posición y configuración de los dobles enlaces, así como por la existencia de otros grupos funcionales. Otra característica para su clasificación es la distribución de los AGs en los alimentos (Belitz et al., 2011). La notación estándar de los TG emplea las iniciales de los AGs dispuestos en el orden de sus posiciones en el esqueleto de glicerol (Holčapek et al., 2005).

En cuanto al contenido de dobles enlaces en su estructura, los ácidos grasos se pueden clasificar en tres grandes grupos: ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados. Se les denomina ácidos grasos saturados a los que no poseen ningún doble enlace, siendo estos flexibles y sólidos a temperatura ambiente. En cambio, los ácidos grasos insaturados tienen en su estructura un doble enlace mientras que los poliinsaturados poseen varios dobles enlaces. A continuación, en la Tabla 1 se exponen los ácidos grasos más comunes agrupados según el número de insaturaciones en su

estructura, junto a su nomenclatura química sistemática, fórmula molecular y alimentos en los que se pueden encontrar.

Tabla 1. Relación de ácidos grasos habitualmente contenidos en alimentos (Baltes, 2006).

<b>ÁCIDOS GRASOS SATURADOS</b>			
<b>Nombre común</b>	<b>Nombre sistemático</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Localización</b>
Ácido caproico	Ácido hexanoico	$C_5H_{11}COOH$	Grasa de pepita de palma, grasa de coco
Ácido caprílico	Ácido octanoico	$C_7H_{15}COOH$	Grasa de coco, grasa de pepita de Palma
Ácido cáprico	Ácido decanoico	$C_9H_{19}COOH$	Grasa de coco, grasa de pepita de palma
Ácido láurico	Ácido dodecanoico	$C_{11}H_{23}COOH$	Grasa de coco, grasa de pepita de palma
Ácido mirístico	Ácido tritradecanoico	$C_{13}H_{27}COOH$	Grasa de coco, grasa de pepita de palma, casi todas las grasas vegetales y animales
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	$C_{15}H_{31}COOH$	Todas las grasas
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	$C_{17}H_{35}COOH$	Principalmente en grasas animales
Ácido alquídico	Ácido eicosanoico	$C_{19}H_{39}COOH$	Grasa de cacahuete
Ácido behénico	Ácido docosanoico	$C_{21}H_{43}COOH$	Grasa de cacahuete, aceite de colza
<b>ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS</b>			
<b>Nombre común</b>	<b>Nombre sistemático</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Localización</b>
Ácido palmitoleico	Ácido 9-hexadecenoico	$C_{15}H_{29}COOH$	Aceites de animales marinos de forma escasa en grasas vegetales y animales
Ácido oleico	Ácido 9-octadecenoico (trans)	$C_{17}H_{33}COOH$	Todas las grasas
Ácido elaídico	Ácido 9-octadecenoico (trans)	$C_{17}H_{33}COOH$	Cantidades mínimas en grasas animales
Ácido erúcico	Ácido 13-docosenoico	$C_{21}H_{41}COOH$	Grasas de crucíferas
<b>ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS</b>			
<b>Nombre común</b>	<b>Nombre sistemático</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Localización</b>
Ácido linoleico	Ácido 9,12-octadecadienoico	$C_{17}H_{31}COOH$	Aceites de cúrcuma, soja girasol y semillas de algodón
Ácido linolénico	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	$C_{17}H_{29}COOH$	Aceite de linaza
Ácido araquidónico	Ácido 5,8,11,14-eicosantetraenoico	$C_{19}H_{31}COOH$	Cantidades mínimas en grasas animales

### 1.3. Caracterización de aceites

Dependiendo de los diferentes intereses que se busquen, se realizará un tipo de análisis u otro para la caracterización de los aceites. Por ejemplo, los productores nacionales deben cumplir las especificaciones de las normas establecidas por el país de origen para la producción y comercialización de aceite. Por otro lado, los exportadores e importadores deben certificar que el producto cumple las normas internacionales que correspondan, mientras el consumidor se fija fundamentalmente en los controles de calidad del producto final (Bernal de Ramírez, 1998).

En nuestro país, las normas UNE sirven para garantizar los niveles de seguridad y calidad relativos a un determinado producto, a través de un conjunto de normas experimentales creadas en los Comités Técnicos de Normalización (CTNs) de la Asociación Española de Normalización. Por otro lado, para establecer los requisitos y las características de los productos y materias primas, existe el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles, en el que se exponen las principales características (aspecto, olor, sabor, color, grado de acidez, etc.) que deben reunir los distintos tipos de aceite de oliva y los distintos aceites de semillas (BOE, 1983). No obstante, según el Reglamento N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y Del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, estos valores no son obligatorios indicarlos en la etiqueta. Entre la información obligatoria que debe constar en el etiquetado de estos productos, se encuentran la denominación del alimento, la lista de ingredientes, la cantidad neta de alimento, la fecha de duración mínima o la fecha de caducidad entre otras indicaciones (Unión Europea, 2011).

A continuación, se exponen algunos de los métodos habitualmente llevados a cabo para la caracterización de los diferentes tipos de aceites vegetales comestibles, clasificándolos en evaluación sensorial, análisis fisicoquímicos y análisis instrumentales:

#### 1.3.1. Evaluación sensorial

El análisis sensorial de los aceites (UNE 55-124-81 y UNE 55-125-81) se debe realizar utilizando un panel de catadores seleccionados y entrenados para dicha evaluación. Además, se debe realizar en una sala de catas específica que evite que las condiciones medioambientales puedan interferir en la respuesta de los catadores (Loyola López et al., 2008).

La cata se divide en varias fases. En primer lugar, se estudia la fase olfativa, donde se debe identificar y cuantificar los aromas y su intensidad. En segundo lugar, se realiza la fase gustativo-táctil. Para ello se toma un sorbo de aceite y se debe indicar el orden de aparición de los estímulos, analizando los atributos dulces en la superficie de la lengua, el amargo al final de esta, el picante en la garganta y la sensación residual al tragar al aceite. Por último, se da la fase retranasal, que se basa en realizar aspiraciones cortas y sucesivas de aire por la boca. Tras ingerir el aceite, éste se calienta a la temperatura corporal, desprendiendo aromas volátiles por vía retranasal, permitiendo así identificar aromas secundarios, y confirmando los percibidos en la primera fase olfativa (Loyola López et al., 2008).

### 1.3.2. Métodos de análisis fisicoquímicos

Uno de los métodos físicos más sencillo y económico para el análisis de aceites, grasas vegetales o grasas animales es la medida del índice de refracción. Este índice está estrechamente ligado a las fuerzas intermoleculares a través de su dependencia con la densidad (Chao Mujica, 2013). En las sustancias grasas, el índice de refracción es proporcional a la gravedad específica, puesto que ambos se elevan al aumentar la proporción de ácidos grasos no saturados y a medida que aumenta el peso molecular (Bernal de Ramírez, 1998). Este parámetro es un indicador de pureza del aceite, existiendo ciertos valores límite para cada tipo de aceite. Además, está relacionado con el grado de saturación de las moléculas, a través del número de dobles enlaces presentes y puede estar influenciado por el deterioro que sufre el aceite tras las reacciones de oxidación durante el procesado y/o el cocinado (Gutiérrez Álvarez, 2003).

Entre los análisis químicos, y más específicamente en el caso de los aceites vegetales comestibles, destacan especialmente tres normas de certificación y análisis: determinación del índice de acidez y de la acidez (UNE-ISO 660:2009), determinación del índice de peróxido (UNE-ISO 3960:2017) y determinación de la materia insaponificable (UNE-ISO 18609:2000). En estas normas se recoge el procedimiento experimental para realizar los correspondientes análisis y así poder determinar la calidad del aceite en cuestión.

#### - Índice de acidez

La acidez de un aceite es un indicador de calidad, de especial importancia en el aceite de oliva virgen, y representa la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el alimento expresado como ácido oleico libre. Este parámetro se puede relacionar con la calidad de la materia prima empleada y el deterioro del aceite durante las etapas de extracción y almacenamiento.

Se entiende por índice de acidez o valor ácido, los miligramos de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres contenidos en un gramo de muestra de aceite. La acidez del aceite se puede expresar también en grados de Koettstorfer que representan los  $\text{cm}^3$  de KOH 1,0 N necesarios para neutralizar la acidez libre de 100 gramos de sustancia grasa (Bernal de Ramírez, 1998).

#### - Índice de peróxidos

La principal causa de la alteración de los aceites ocurre por la presencia de reacciones térmicas, químicas y bioquímicas, siendo la oxidación química de las grasas la más frecuente. Como consecuencia de estas reacciones, aparece la formación de peróxidos debido a la reacción de los dobles enlaces de los ácidos grasos constituyentes con el oxígeno del aire. Estos compuestos al descomponerse originan otros, a los cuales se les atribuye el olor y sabor desagradables característicos de las grasas oxidadas, también conocido como rancidez. Por este motivo, el índice de peróxidos sirve para representar el deterioro oxidativo que sufren los aceites (Rivera et al., 2014).

Este índice se puede definir como la cantidad de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico, expresado en mili equivalentes de oxígeno activo por kg de grasa (Arango Parrado, 2011).

- Índice de materia insaponificable

El contenido de materia insaponificable de una muestra de aceite es la parte que no está formada por compuestos grasos. Generalmente representan el 2% del peso del aceite, son fundamentalmente esteroides, tocoferoles, carotenoides o pigmentos (Gutiérrez Álvarez, 2003) y se eliminan durante el proceso de refinado.

El índice de materia insaponificable es igual a la cantidad total de sustancias disueltas en el aceite que, después de la saponificación, no son solubles en soluciones acuosas, pero sí en los solventes orgánicos usados en la determinación (Gutiérrez Álvarez, 2003).

### 1.3.3. Métodos de análisis instrumentales

Los métodos instrumentales presentan grandes ventajas respecto a los métodos clásicos, fundamentalmente por no precisar de una separación previa de los analitos, ya que las propiedades estudiadas son muy específicas. En general, estos métodos son más sensibles que los métodos clásicos ya que detectan concentraciones más bajas de analito además de ser más selectivos (Faraldos & Goberna, 2012). La mayoría de las técnicas instrumentales empleadas en el análisis y la caracterización de alimentos, se engloban en una de las tres áreas principales: espectroscopia, electroquímica y cromatografía (Gomis Yagües, 2008).

En concreto, destacan las técnicas de cromatografía que combinadas con el detector adecuado, permiten la separación, identificación y determinación cuantitativa de diferentes componentes químicos en mezclas complejas. Los métodos cromatográficos son procesos que abarcan varias técnicas de separación, basadas en propiedades físicas de ciertos materiales que, en interacción con sustancias o mezclas de sustancias, permiten descomponer una mezcla y analizar sus constituyentes de manera individual. Los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario (fase estacionaria), que recibe el contenido de la mezcla, mientras que la otra fase es un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario empujando los compuestos y produciendo simultáneamente la separación de estos (fase móvil) (Sgariglia et al., 2010).

Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar según el mecanismo de separación (Chicharro et al., s. f.):

- a. Cromatografía de reparto. Su fundamento químico se basa en la diferencia de solubilidad relativa del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria. La fase estacionaria se compone de un líquido que debe estar soportado sobre un sólido. Este sólido debe ser inerte, no puede reaccionar ni con la muestra ni con ninguna de las dos fases, y debe formar un enlace suficientemente fuerte con la película líquida que lo recubre, que se va debilitando con el uso de la columna de cromatografía.
- b. Cromatografía de adsorción. Puede ser tanto cromatografía líquida como gaseosa y sea cual sea la fase móvil dentro de la columna de separación, siempre habrá un sólido en donde se produce la retención de las especies químicas de interés.
- c. Cromatografía de exclusión molecular. En este caso no existe interacción entre el analito y la fase estacionaria, la separación de los componentes de una mezcla se logra atendiendo al tamaño, es decir, la fase estacionaria está constituida por un sólido poroso con un tamaño de poro determinado y acorde al analito que se desea separar.

- d. Cromatografía de intercambio iónico. Es un método que permite la separación de moléculas basado en sus propiedades de carga eléctrica. Debido a la presencia de fuerzas electrostáticas entre la fase estacionaria y el analito estudiado, los solutos quedaran más o menos retenidos en la columna y se producirá la separación correspondiente.

Según el estado de la fase móvil, se distinguen dos tipos de cromatografías: cromatografía gaseosa, cuando la fase móvil es un gas, y cromatografía líquida, cuando esta es un líquido. En la cromatografía de gases no sólo la fase móvil debe ser un gas sino que también debe serlo la mezcla a separar, por lo que requiere un paso previo de volatilización de la muestra (Sgariglia et al., 2010). Mediante esta técnica, se logran separar los compuestos volátiles, que fluyen en una corriente gaseosa a través de una fase estacionaria quedándose retenidos con mayor o menor fuerza y llegando al detector con tiempos de retención distintos (Chicharro et al., s. f.).

En cuanto a la cromatografía líquida, la técnica más habitual es la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizada generalmente con fines analíticos, concretamente, para identificar y/o cuantificar compuestos de una mezcla en combinación con sistemas de detección, aunque también se puede usar con fines preparativos y posterior análisis mediante otras técnicas como RMN.

El estudio de los parámetros de calidad de los aceites vegetales fundamentalmente se lleva a cabo empleando técnicas analíticas instrumentales como son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Arias, 2019). En concreto, según los métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, para medir la calidad del aceite se realiza el análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases (UNE-EN ISO 12966-4:2015). Para ello, es necesario realizar una reacción de transesterificación de los TGs presentes antes de analizar la muestra (UNE-EN ISO 12966-2:2017) (Panreac Química, s. f.). Para este tipo de cromatografía se utilizan habitualmente detectores de tipo FID o TCD entre otros.

También es posible el estudio de la composición y calidad de diversos aceites mediante el empleo de cromatografía líquida HPLC, como se recoge en las normas oficiales de análisis UNE-EN ISO 15302:2017; UNE-EN ISO 15788-2:2005; UNE-EN ISO 22959:2010 y UNE-EN ISO 9936:2016, entre otras.

#### 1.4. HPLC

Entre las técnicas cromatográficas con fase móvil líquida, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la más utilizada en el análisis de alimentos. En este sentido, uno de los primeros trabajos publicados es el de Pei *et al.*, (1975) en el que se proponía un método de HPLC para la separación de TGs de cadena media en una columna de fase reversa. Desde ese momento, otros investigadores han mejorado y optimizado el método de separación de TGs, siendo la cromatografía HPLC la técnica más empleada en la actualidad y que mejores resultados ofrece para el análisis de estas especies moleculares. Mediante esta técnica, los TGs son separados en base a su longitud de cadena, su número de insaturaciones, su polaridad y su configuración molecular, lo que permite una determinación precisa de la composición lipídica de una grasa (Perona et al., 1999).

Un cromatógrafo de líquidos HPLC consta de una serie de elementos indispensables que se muestran en la Figura 2.

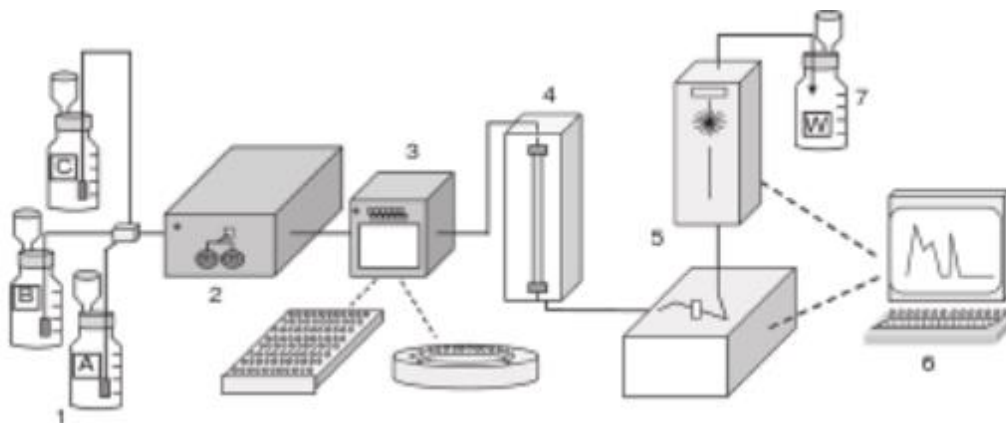


Figura 2. Principales componentes de un equipo HPLC: (1) Reservorios; (2) bomba; (3) inyector automático con diferentes carruseles de muestras; (4) columna cromatográfica; (5) detectores en serie; (6) sistema de tratamiento de datos; (7) botella para desechos (Faraldos & Goberna, 2012).

Estos elementos son los siguientes (Ayora Cañada, s. f.; Faraldos & Goberna, 2012):

**(1) Reservorios y fases móviles:** los equipos HPLC suelen incorporar de 2 a 4 reservorios que permiten la preparación automatizada de mezclas de disolventes como fase móvil.

**(2) Sistema de bombeo:** es el dispositivo encargado de proporcionar la presión necesaria a la fase móvil para atravesar, al flujo seleccionado, la columna cromatográfica y el resto del sistema. Cuando la composición de la fase móvil no se modifica durante el análisis, se habla de un sistema de bombeo isocrático, aunque suele ser conveniente trabajar con bombas capaces de proporcionar gradientes. Para la formación de gradientes, se disponen varios reservorios con distintas fases móviles y la bomba varía la proporción relativa de los distintos componentes durante el análisis.

**(3) Sistema de inyección de muestra:** el inyector es un dispositivo que permite, mediante el empleo de válvulas, incorporar la muestra a la fase móvil antes de que entre en la columna sin pérdidas de presión que alteren el flujo constante de la bomba. Este dispositivo puede ser manual o automático, y permite variar el rango de volumen inyectado. Además, los sistemas de inyección automáticos o auto-muestreadores disponen de termostatación y presentan una mayor precisión que los manuales, optimizando así el rendimiento del equipo HPLC y mejorando la reproducibilidad de los análisis.

**(4) Columna cromatográfica:** la columna es la parte más importante del sistema. Existen diferentes tipos de columnas atendiendo a la naturaleza química de su fase estacionaria, su longitud, su diámetro, su tamaño de partícula, así como el diámetro de poro y la homogeneidad de las partículas que constituyen el relleno. Es importante utilizar las precolumnas y las columnas adecuadas y de longitud suficiente para separar los compuestos de interés en cada muestra analizada.

**(5) Sistema de tratamiento de resultados:** se trata de un software informático específico, que transforma los datos analíticos en resultados mediante la representación gráfica en cromatogramas o valores numéricos mostrados en diversas tablas.

**(6) Botella para residuos:** se coloca en la parte final del HPLC, para acumular todos los disolventes ya utilizados, para su posterior gestión o reciclado.

**(7) Uno o varios detectores:** el detector ideal en HPLC debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal, tener poco ruido de fondo y ser estable en el



tiempo. Algunos de los detectores más usados son los detectores espectrofotométricos que miden la absorbancia a una o varias longitudes de onda en el ultravioleta (UV) o en el visible (Vis).

En este tipo de cromatografía es habitual utilizar diferentes tipos de detectores, clasificándose en dos tipos básicos. Por un lado, se pueden encontrar los detectores basados en una propiedad de la disolución que responden a una característica de la fase móvil, como puede ser el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifica en presencia de los analitos. Por otro lado, se encuentran los detectores basados en una propiedad del soluto, que responden a alguna de las propiedades específicas, como la absorbancia UV, fluorescencia, o intensidad de difusión, si bien los primeros suelen constituir los modos de detección más frecuentes.

En concreto, el detector de absorción UV, tiene un papel importante en la cromatografía HPLC, ya que se utiliza hasta en el 71% de los casos (Gomis Yagües, 2008). Este detector se utiliza para analitos que absorben luz en el rango del espectro ultravioleta (con longitudes de onda de 195 a 400 nm) o en el rango de luz visible (entre 400 y 780 nm) y permite su cuantificación cromatográfica. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilo y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores como el pH, la concentración y el disolvente empleado, que alteran la carga de las moléculas, pueden provocar desplazamientos de las señales de los espectros UV (Díaz et al., s. f.).

El estudio de espectros en el rango UV-Vis de un elevado número de moléculas ha permitido establecer correlaciones entre la estructura y posiciones de los máximos de absorción de radiación. Las más conocidas son las reglas empíricas establecidas por Woodward, Fieser y Scott, referidas a compuestos carbonílicos insaturados, dienos o esteroides. A partir de las tablas en las que se recogen, en forma de incrementos, diversos factores y particularidades de estructura, se puede predecir la posición de la banda de absorción  $\pi \rightarrow \pi^*$  de estos sistemas conjugados (Figura 3) (Rouessac et al., 2003).

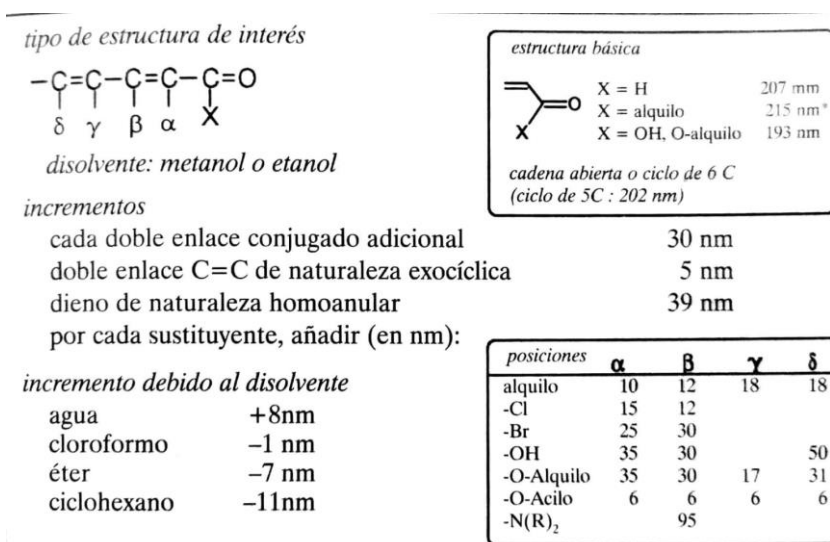


Figura 3. Correlación en espectrometría UV-Vis. Reglas de Woodward-Fieser-Scott para el cálculo de la posición del máximo de absorción de enonas y dienonas (precisión 3nm) (Rouessac et al., 2003).

El análisis de los aceites empleando equipos de HPLC, se basa habitualmente en el estudio de las áreas relativas de los picos cromatográficos. Sin embargo, la intensidad de las señales obtenidas con un detector ultravioleta depende del número de dobles enlaces y la longitud de la cadena de acilo (Holčapek et al., 2005), por lo que es importante tener en cuenta las diferentes respuestas a la absorción de radiación UV obtenidas por parte de los diferentes TG que componen la muestra.

Por este motivo, y con el fin de facilitar la posterior identificación de cada TG, se utiliza el número de carbonos equivalentes (ECN) como medida de la polaridad y por tanto orden de aparición de los diferentes compuestos en el cromatograma (Holčapek et al., 1999, 2003; Komaram et al., 2021). El ECN (equivalent carbon number), está definido como (de la Mata-Espinosa, 2011):

$$ECN = CN - 2 \cdot DB$$

Donde CN es el número de carbonos acilos (en las cadenas grasas) y la DB es la suma de los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos que conforman los triglicéridos. En la Tabla 2 se exponen los ECN de los principales triacilglicéridos.

Tabla 2. Notaciones, nombres y número equivalente de carbón (ECN) de los principales triacilglicéridos. Tabla adaptada de (Holčapek et al., 2005)

Notación	Nombre	ECN
LLL	Trilinoleína	42
LLO	Dilinoil-oleil-glicerol	44
LLP	Dilinoil-palmitil-glicerol	44
LOO	Linoleil-dioleil-glicerol	46
LPP	Linoleil-dipalmitil-glicerol	46
OLP	Oleil-linoleil-palmitil-glicerol	46
OOO	Trioleína	48
OOP	Dioleil-palmitil-glicerol	48
PPP	Tripalmitina	48
OPP	Oleil-dipalmitil-glicerol	48

## 2. Objetivos

El objetivo principal de esta investigación es la caracterización del perfil de ácidos grasos de determinados aceites vegetales comestibles empleando un equipo de cromatografía líquida y un detector de Ultravioleta (UV). Cada aceite es una mezcla compleja de triacilglicéridos, de diferente composición, y cuyas diferencias radican principalmente en las posiciones de los ácidos grasos en el esqueleto del glicerol, en la longitud de las cadenas de carbono de cada uno de estos ácidos, así como en el número y posiciones de los dobles enlaces presentes en las moléculas. Estos parámetros son los que nos van a permitir la identificación de los diferentes triacilglicéridos en función del tiempo de elución por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para conseguir el objetivo principal de este trabajo, se plantean varios objetivos específicos:

- En primer lugar, se estudiará la estructura química y molecular de los ácidos grasos que componen los triglicéridos con el fin de determinar el número de carbonos y dobles enlaces presentes en la cadena.
- Se calculará el número equivalente de carbón (ECN) para cada uno de los triglicéridos presentes en cantidades mayoritarias en todos los aceites estudiados.
- Se calcularán las probabilidades teóricas de aparición de todos los triacilglicéridos correspondientes a la combinación de los ácidos grasos mayoritarios en cada una de las muestras.
- Se compararán las probabilidades calculadas con las señales recogidas en los cromatogramas de los aceites vegetales estudiados.
- Finalmente, se propondrá una posible aplicación del análisis de triglicéridos mediante HPLC en muestras de conservas de pescado en aceite para estudiar la calidad de estos y el cumplimiento de su etiquetado.

Todos estos objetivos específicos permitirán la caracterización del perfil de ácidos grasos de composición mayoritaria en distintos aceites vegetales mediante HPLC, estableciendo así el correspondiente tiempo de retención para cada triacilglicérido en las condiciones establecidas en este trabajo.

### 3. Materiales y métodos

La investigación aquí descrita se llevó a cabo a nivel experimental utilizando las instalaciones de los laboratorios de investigación del Departamento de Ciencias situado en el Edificio Los Acebos del Campus de Arrosadía de la Universidad Pública de Navarra.

#### 3.1. Reactivos líquidos y sólidos

A continuación, se incluye una relación de los productos químicos empleados en el trabajo. Además, se recogen las características de los diferentes aceites vegetales con distinta composición en ácidos grasos que se utilizaron, así como las referencias correspondientes a las muestras de conserva en aceite estudiadas:

- Disolventes:
  - Hexano: n-Hexane, 96%, Multidissolvent® HPLC grade ACS UV-VIS (Scharlau).
  - Isopropanol: 2-Propanol, gradient HPLC grade (Scharlau).
  - Acetonitrilo: Acetonitrile, Multidissolvent® HPLC grade ACS UV-VIS, Reas Ph Eur. (Scharlau).
  
- Compuestos patrón empleados en la identificación de los TGs:
  - Glyceryl tripalmitate, Aprox. 99% (Sigma-Aldrich)
  - Glyceryl trioleate (Sigma-Aldrich)
  - Glyceryl trilinoleate (Sigma-Aldrich)
  
- Aceites vegetales estudiados:
  - Aceite de oliva: de la marca *ifa eliges*, que contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes.
  - Aceite de girasol refinado comercial (*Urzante*, Navarra).
  - Aceite de soja: se trata de un aceite de soja producido en Marruecos.
  - Aceite de maíz: aceite refinado de germen de maíz de la marca *ASUA*.
  - Aceite de aguacate: se trata de un aceite no refinado de la marca *ethnos*, en cuyos ingredientes se indica que puede contener trazas de frutos secos, sésamo.
  - Aceite de cacahuete: es un aceite no refinado de cacahuete tostado, de la marca *Asia Green Garden*.
  - Aceite de palma: se trata de un aceite de palma (*ZOMI PALM OIL*) producido en Malaysia y distribuido por Londres.
  - Aceite de sésamo: es un aceite de sésamo prensado en frío, de la marca *Asia Green Garden*.
  
- Conservas en aceite:
  - Sardinillas en aceite de girasol de la marca *Hacendado*
  - Atún claro en aceite de oliva de la marca *Carrefour*

### 3.2. Equipo utilizado

El equipo empleado en el análisis de los diferentes aceites es un dispositivo de cromatografía líquida HPLC cuyas características se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Características del equipo de HPLC empleado

Maquinaria	Marca	Modelo	Función/descripción
Desgasificador de vacío	Agilent	1100	Elimina cualquier gas disuelto en los disolventes antes de ser bombeados.
Bomba cuaternaria	Agilent	1100	Permite generar una mezcla de los disolventes de las botellas A, B, C y D del equipo, así como cambiar la composición de la fase móvil durante el análisis.
Automuestreador	Agilent	1100	De volumen variable (1-100 $\mu\text{L}$ ), con capacidad de hasta 100 muestras.
Compartimento termostático de columna	Agilent	1200	Calentamiento y refrigeración mediante el efecto Peltier, desde 10 grados por debajo de la temperatura ambiente a 80 $^{\circ}\text{C}$ , con capacidad para 3 columnas de HPLC
Precolumna	ProntoSIL	ProtoSIL hypersorb ODS 5,0 $\mu\text{m}$	Relleno Hypersorb ODS, tamaño de poro de 120 $\text{\AA}$ , diámetro interno de 6 mm y tamaño de partícula de 150 $\mu\text{m}$ . Con unas dimensiones de 150 x 4,6 mm.
Columna de cromatografía	Kromasil	100-5C18	Relleno de Octadecil silano unido químicamente a sílice porosa, tamaño de poro de 100 $\text{\AA}$ y tamaño de partícula de 5 $\mu\text{m}$ . Con una fase estacionaria C18. Con unas dimensiones de 250 x 4,6 mm.
Detector UV de Longitud de Onda Variable	Agilent	1100 (G1314A)	Detector de doble haz, con lámpara de Deuterio.

### 3.3. Procedimiento de análisis

Para llevar a cabo el análisis cromatográfico, en primer lugar, se preparan las muestras de aceite, diluyendo 150  $\mu\text{L}$  de muestra en 5 mL de disolvente (hexano). Una vez preparada la muestra con la concentración deseada se trasvasa a los viales compatibles con el inyector automático del HPLC.

En el caso de las muestras de conservas alimentarias, se lleva a cabo un procedimiento similar al que se utiliza para analizar las muestras de aceite vegetal. Se diluye 150  $\mu\text{L}$  de muestra (aceite contenido en la lata de conserva) en 5 mL de disolvente (hexano). Y una vez preparada la muestra con la concentración deseada, se trasvasa a los viales empleando un filtro de jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$ . De esta manera, se consigue obtener una muestra libre de sustancias en suspensión procedentes del alimento.

Una vez preparadas las muestras, y antes de encender el cromatógrafo y el ordenador se comprueba que hay suficiente cantidad de los disolventes (acetonitrilo, isopropanol y hexano) para realizar el análisis. Seguidamente se enciende el ordenador y todos los módulos del equipo de HPLC (sonicador, bomba, inyector automático, horno y detector).

El software de control del equipo es OpenLab. Al encender el programa se puede seleccionar el detector a utilizar, en este caso el VWD (ultravioleta), y se carga el método de análisis con el que se quiere trabajar.

Una vez seleccionado el método (explicado a continuación en el siguiente apartado), hay dos formas de indicarle al equipo las muestras a inyectar:

- Single sample: en el caso que solo se quiera pinchar una muestra, se indica la posición del vial correspondiente y el nombre de la muestra.
- Sequence table: si se quieren analizar varias muestras, se añaden a la tabla tantas filas como sea necesario especificando el nombre, la posición del vial, el volumen de inyección y el método de análisis.

En ambos casos es recomendable pinchar primero una muestra de hexano para limpiar las impurezas que puedan haberse quedado de análisis anteriores y comprobar que el equipo se encuentra en condiciones óptimas para comenzar los análisis.

### 3.3.1. Condiciones del análisis

Para realizar el análisis de los aceites vegetales estudiados se ha trabajado con un método cromatográfico con las siguientes condiciones:

- La fase móvil se trata de una mezcla de tres disolventes con una composición volumétrica inicial de 60% acetonitrilo (ACN), 22,4% isopropanol (IPA) y 17,6% Hexano. Este equipo nos permite trabajar en gradiente, variando la proporción de los disolventes y por tanto la composición de la fase móvil durante los 26 minutos de análisis, manteniendo en todo momento un caudal constante. El programa de bombeo con el que se ha trabajado se muestra en la Tabla 4.

*Tabla 4. Condiciones de bombeo de la fase móvil*

Tiempo (min)	ACN (%)	IPA (%)	Hexano (%)	Caudal (mL/min)	Presión máxima (bar)
0	60,0	22,4	17,6	1	400
15	40,0	33,3	26,7	1	400
20	60,0	22,4	17,6	1	400
26	40,0	22,4	17,6	1	400

- Como fase estacionaria se usan una precolumna y una columna colocadas en serie que se encuentran alojadas dentro de un compartimento termostaticado u horno con una temperatura establecida de 40 °C con una desviación de  $\pm 5$  °C.
- Con respecto al programa de inyección, se inyectan 10  $\mu$ L de muestra automáticamente. Cada vez que el equipo inyecta una muestra, se realiza una limpieza de la jeringa y la

aguja con el vial situado en la posición 91 que contiene hexano (uno de los componentes de la fase móvil y el disolvente empleado en la preparación de las muestras). Además, también se establece la velocidad de extracción y de expulsión de la muestra, ambas de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Así como cuántos mm se tiene que introducir la aguja en el vial, en este caso 4 mm.

- En cuanto al detector utilizado para el análisis, se trata de un VWD que trabaja a una longitud de onda variable, y en concreto en este trabajo, de 205 nm.

Una vez finalizado el análisis de cada muestra, gracias al software OpenLab se podrán obtener automáticamente los cromatogramas, y se realizarán las integraciones correspondientes para todos los análisis realizados.

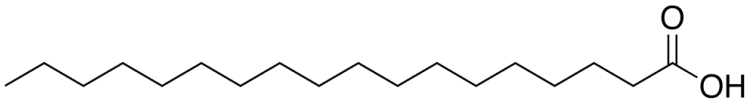
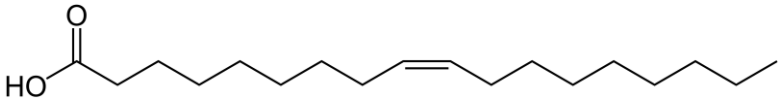
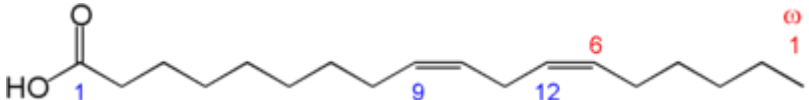
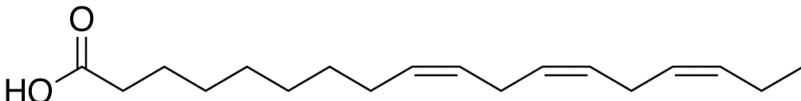
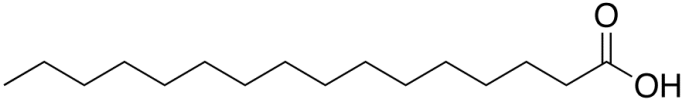
#### 4. Resultados y discusión

En este apartado se recogen los principales resultados obtenidos durante la realización del trabajo que se encuentran organizados siguiendo los objetivos específicos planteados en el apartado correspondiente.

##### 4.1. Estructuras moleculares y cálculo del ECN

A continuación, en la Tabla 5 se expone la información más relevante de los ácidos grasos mayoritarios de los aceites estudiados. Se puede observar su estructura molecular, con el número de carbonos (CN) y sus dobles enlaces (DB). Estas características son las que posteriormente nos van a permitir calcular el ECN.

Tabla 5. Características de los ácidos grasos estudiados en el trabajo

Nombre	Estructura	CN	DB
Ácido esteárico		18	0
Ácido oleico		18	1
Ácido linoleico		18	2
Ácido linolénico		18	3
Ácido palmítico		16	0

Como se puede observar en la Tabla 5, a excepción del ácido palmítico, todas las moléculas consideradas en este trabajo están formadas por una cadena lineal de 18 átomos de C (16 en el caso del ácido palmítico). Además, tanto el ácido esteárico como el palmítico son compuestos saturados, mientras que el resto presentan insaturaciones en su estructura: un único doble enlace en el ácido oleico, dos dobles enlaces en el ácido linoleico y hasta tres en el ácido linolénico.

En base a la estructura molecular de cada ácido graso (ácido esteárico, ácido oleico, etc.) se puede calcular el ECN. Mediante el ECN se facilita la posterior identificación de cada TG que componen el aceite, ya que este número se puede utilizar como una medida de la polaridad de las moléculas y por tanto el orden de aparición de los diferentes compuestos en los cromatogramas. Es decir, el ECN determina el orden de elución en sentido creciente, a mayor ECN, mayor tiempo de retención tendrá el compuesto en cuestión. Para tratar de establecer el orden de elución de compuestos con el mismo ECN se hace uso de la Tabla 2 del artículo publicado por Holčapek *et al.* sobre la caracterización de triacilglicéridos y diglicéridos (Holčapek *et al.*, 2003).

Para facilitar la identificación de los diversos compuestos se prepararon tres muestras de patrones comerciales de los triglicéridos: LLL, OOO, PPP, y se analizaron individualmente en las mismas condiciones que las muestras de análisis. De esta manera, se consigue obtener los tiempos de retención (tR) correspondientes, definidos como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta del detector, siendo un parámetro de interés para la identificación de los compuestos separados.

En la Tabla 6 se recogen los ECN calculados para los TGs estudiados, ordenados en sentido creciente, junto al número de carbonos y de dobles enlaces, que se utilizarán para la posterior identificación de los picos de los distintos cromatogramas. Además, se indican los tR de los diversos compuestos que se han podido identificar entre los que constituyen las muestras analizadas. Como se observa en la columna de los tR varios compuestos no tienen ningún valor asignado, debido a la imposibilidad de identificación, en las muestras estudiadas.

Tabla 6. Características de los principales triacilglicéridos presentes en las muestras de aceite. CN: número de carbonos de las cadenas aciladas; DB: número de dobles enlaces de las cadenas aciladas; ECN: número equivalente de carbonos, tR tiempo de retención en las condiciones estudiadas

Compuesto	Notación	CN:DB	ECN	tR (min)
Trilinolenina	LnLnLn	52:9	34	-
Linoleil-dilinolenil-glicerol	LLnLn	54:8	38	9,69
Dilinoleil-linolenil-glicerol	LLLn	54:7	40	10,87
Oleil-dilinolenil-glicerol	OLnLn	54:7	40	-
Dilinolenil-palmitil-glicerol	LnLnP	52:6	40	-
Trilinoleína	LLL	54:6	42	12,01
Oleil-linoleil-linolenil-glicerol	OLLn	54:6	42	12,13
Linolenil-linoleil-palmitil-glicerol	LnLP	52:5	42	12,33
Oleil-linolenil-oleil-glicerol	OLnO	54:5	44	-
Dilinoleil-oleil-glicerol	LLO	54:5	44	13,34
Dilinoleil-palmitil-glicerol	LLP	52:4	44	13,60
Oleil-linolenil-palmitil-glicerol	OLnP	52:4	44	-
Dilinoleil-estearil-glicerol	LLS	52:4	44	-
Palmitil-linolenil-palmitil-glicerol	PLnP	50:3	44	-
Linoleil-dioleil-glicerol	LOO	54:4	46	14,71
Linoleil-oleil-palmitil-glicerol	LOP	52:3	46	15,04
Linoleil-oleil-estearil-glicerol	LOS	52:3	46	-



Linoleil-dipalmitil-glicerol	LPP	50:2	46	15,39
Trioleina	OOO	54:3	48	16,26
Diroleil-palmitil-glicerol	OOP	52:2	48	16,59
Linoleil-palmitil-estearil-glicerol	LPS	52:2	48	-
Tripalmitina	PPP	48:0	48	17,42
Oleil-dipalmitil-glicerol	OPP	50:1	48	17,8
Diroleil-estearil-glicerol	OOS	54:2	50	18,02
Linoleil-diestearil-glicerol	LSS	54:2	50	-
Oleil-palmitil-estearil-glicerol	OPS	52:1	50	18,11
Dipalmitil-estearil-glicerol	PPS	50:0	50	18,83
Oleil-diestearil-glicerol	OSS	54:1	52	19,6
Palmitil-diestearil-glicerol	PSS	52:0	52	19,02
Triestearina	SSS	57:0	57	20,07

#### 4.2. Cálculo teórico de probabilidades de aparición de los TGs

Para llevar a cabo el análisis de la composición de TGs de los diferentes aceites vegetales estudiados se hace uso de la combinatoria para el cálculo de la probabilidad teórica de aparición de los triglicéridos individuales en las composiciones específicas para cada aceite. De esta manera, se pueden distinguir los componentes mayoritarios facilitando la posterior identificación de los picos característicos en los cromatogramas obtenidos.

Hay que tener en cuenta que un TG contiene tres ácidos grasos, de manera que es posible la formación de diferentes TG debido a las múltiples combinaciones de ácidos grasos. Se pueden dar tres casos: el primero de ellos es que los tres ácidos grasos que constituyen el TG sean diferentes (por ejemplo, OPL); el segundo caso, que los tres ácidos grasos que conformen el TG sean iguales (OOO) o finalmente que dos ácidos grasos sean iguales y uno sea diferente (LLO). De esta manera, podemos establecer agrupaciones formadas por 3 elementos que pueden repetirse, eligiéndolos de entre todos los ácidos grasos posibles. Por simplificar el cálculo, en este trabajo se van a considerar en primera instancia los ácidos grasos mayoritarios ( $\geq 3-4\%$ ) en las composiciones específicas para cada aceite analizado.

Para realizar todas estas combinaciones y estimar sus probabilidades se utiliza una hoja Excel para calcular la probabilidad de aparición de cada ácido graso en cada molécula de triglicérido mediante el uso de las siguientes ecuaciones, (siendo  $w_i$  el contenido en peso del ácido graso  $i$ , en un TG concreto):

- Cuando los tres ácidos grasos de la molécula son diferentes:

$$P_{i,j,k} = w_i \times w_j \times w_k \text{ (Ec. 1)}$$

- Cuando los tres ácidos grasos de la molécula son iguales:

$$P_{i,j,k} = w_i \times (w_i - 1) \times (w_i - 2) \text{ (Ec. 2)}$$

- Cuando dos ácidos grasos que forman el TG son iguales y uno es diferente ( $i=j \neq k$ ):

$$P_{i,j,k} = w_i \times (w_i - 1) \times w_k \text{ (Ec. 3)}$$

Una vez calculadas las probabilidades individuales para cada ácido graso en cada molécula de TG, hay que calcular las probabilidades grupales, para cada TG, teniendo en cuenta cuántas veces se repite cada ácido graso en cada una de las estructuras de TG consideradas.

A modo de ejemplo se incluye el cálculo correspondiente al TG: LLO en el aceite de oliva:

Tabla 7. Ejemplo de cálculo realizado para determinar la probabilidad para cada una de las combinaciones de los ácidos grasos considerados en un aceite

	Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>				
<b>LLO</b>	1	1	2	5,85E+03	3	1,76E+04	<b>1,8%</b>

En primer lugar, antes de comenzar con el cálculo de probabilidad, a cada ácido graso se le asigna un valor L (1), O (2), P (3) y S (4). A continuación, se cumplimentan las casillas de las posiciones relativas en las que se sitúan los AG en las agrupaciones formadas por tres elementos, TG, cuyo valor puede repetirse. En el ejemplo mostrado en la tabla, el TG está formado por dos moléculas de L (con valor asignado de 1) en las posiciones 1 y 2 del TG, y una molécula de O (con valor asignado de 2) en la posición 3 del TG.

En la siguiente columna se procede al cálculo de la probabilidad individual (5,85E+03). Dependiendo del tipo de combinación entre los tres ácidos grasos se utiliza una de las ecuaciones comentadas anteriormente en la casilla de cálculo de probabilidad individual:

- Ecuación 1 cuando los tres ácidos grasos de la molécula son diferentes
- Ecuación 2 cuando los tres ácidos grasos de la molécula son iguales
- Ecuación 3 cuando dos ácidos grasos que forman el TG son iguales y uno es diferente (como es el caso del ejemplo recogido en la tabla 7)

En la columna denominada número de casos, se calcula el número de posibles combinaciones que se pueden dar modificando la posición relativa de cada ácido graso que conforma el triacilglicérido (por ejemplo, el TG LLO tiene tres posibles combinaciones variando las posiciones de las moléculas que lo conforman: dos de ácido linoleico y una de oleico, así se podrían establecer las combinaciones alternativas LLO, LOL y OLL).

Seguidamente se procede al cálculo de la probabilidad grupal que consiste en multiplicar el valor de la probabilidad individual (5,85E+03) por el número de casos que se pueden dar (3), obteniéndose así en el ejemplo mostrado, un valor de 1,76E+04.

Para calcular la probabilidad expresada como porcentaje de que se de esa combinación concreta para un triglicérido, se debe sumar el número total de casos y también todas las probabilidades grupales. Una vez calculados estos datos, se procede al cálculo de la probabilidad, que consiste en dividir la probabilidad grupal del triglicérido en cuestión (LLO) entre la probabilidad total. Obteniéndose una probabilidad de aparición de un 1,8% en el ejemplo aquí explicado.

Teniendo esto en cuenta, si se estudian las combinaciones para los TG formados por 4 tipos diferentes de ácidos grasos mayoritarios (L, O, P, S), se dan un total de 64 combinaciones. Teniendo en cuenta que en el análisis de HPLC no podemos distinguir la posición relativa del radical en la estructura inicial de glicerol, las combinaciones realmente identificables se reducen a 20.

Los valores obtenidos en el cálculo de las probabilidades teóricas de aparición de los triglicéridos estudiados en los diferentes aceites vegetales se exponen en el “Anexo II. Tablas probabilidades teóricas de aparición de los distintos TGs”. Asimismo, se analizarán e identificarán individualmente los cromatogramas mediante las probabilidades de mayor significancia.

### 4.3. Cromatogramas y probabilidades

Una vez calculados los parámetros de probabilidad y ECN se procede a la identificación de las señales recogidas en los cromatogramas de las muestras de los ocho tipos de aceite estudiados (oliva, girasol, palma, soja, sésamo, maíz, cacahuete y aguacate).

En primer lugar, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de oliva.

Tabla 8. Probabilidades para el aceite de oliva

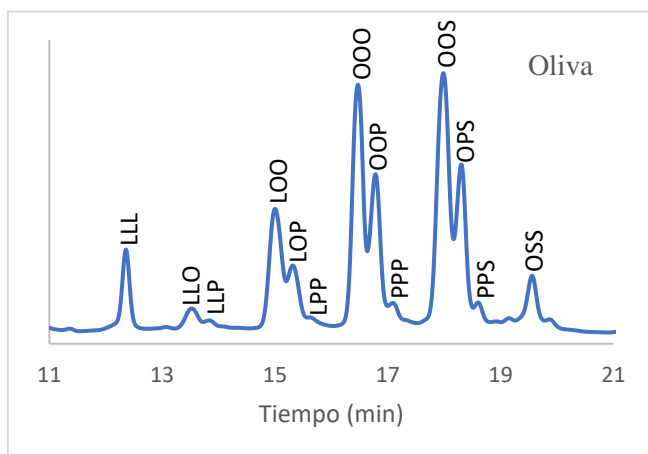


Figura 4. Cromatograma del aceite de oliva

Oliva	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
OOO	43,5
OPS	20,6
LOO	16,4
OOS	5,3
LOP	5,1

En el aceite de oliva el ácido graso mayoritario es el ácido oleico (70,4%), seguido en mucha menor proporción del ácido palmítico (10,8%) y ácido linoleico (8,6%). Por ello las combinaciones de triglicéridos mayoritarias están formadas principalmente por este ácido oleico combinado con los otros dos ácidos grasos.

En la Tabla 8 se recogen los valores arrojados por el cálculo teórico de las combinaciones más probables entre los 4 ácidos grasos más abundantes en el aceite de oliva: ácido oleico (O), linoleico (L), palmítico (P) y esteárico (S). Estos valores, se encuentran en el rango de los aportados en estudios previos (Fedeli, 1977), donde se asigna una distribución de especies de triglicéridos para el aceite de oliva de: 40-59% para OOO, 12-20% para LOO, 5-5,7% para LOP, 3-7% para OOS y 4-5% para LOP.

Gracias a los patrones analizados (LLL, OOO y PPP) se pueden identificar fácilmente los picos correspondientes en la Figura 4, ya que se conocen sus tiempos de retención. Como se puede observar, las señales correspondientes a los triglicéridos OOO y OOS son las más intensas, debido a que tienen una mayor interacción con la longitud de onda UV en la que se está trabajando. Esto se debe fundamentalmente a la presencia de dobles enlaces que tienen en su composición: el triglicérido OOO tiene tres dobles enlaces mientras que el OOS tiene dos insaturaciones, lo que condiciona de manera importante el tamaño de las señales características con respecto a otros TG que se encuentran en una mayor proporción, como puede ser el OPS.

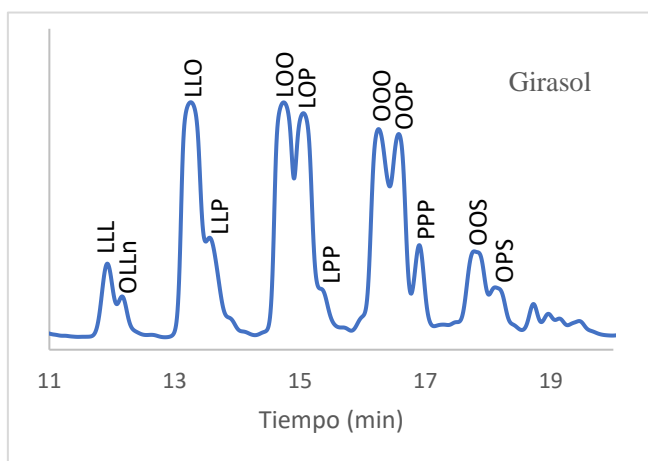
Otro compuesto que da una señal significativa es el OOP, que tiene el mismo valor de ECN (48) que el OOO y por ello saldrán con un tiempo de retención similar, y gracias a los dobles enlaces se puede conocer que el que da una menor señal es el OOP frente al OOO, debido a que el OOP cuenta con dos dobles enlaces en su estructura molecular mientras que el OOO cuenta con uno

más, correspondiéndose así al pico de mayor intensidad. Esto mismo ocurre con los picos OOS y OPS que tienen el mismo valor de ECN (50), y mientras el primero de estos tiene dos dobles enlaces, el segundo solo tiene uno, por lo que el OOS se corresponderá con el primer pico de mayor tamaño, y el OPS con el segundo.

Además, se logra identificar el triglicérido formado por tres ácidos grasos palmíticos (PPP, con 0.1% de probabilidad) dando lugar a un pico de altura mínima puesto que el ácido palmítico no presenta ningún doble enlace en su composición. Por ello, aun siendo el segundo ácido graso mayoritario en la composición del aceite de oliva, dará una respuesta apenas apreciable en su interacción con el detector de ultravioleta.

En segundo lugar, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de girasol.

Tabla 9. Probabilidades para el aceite de girasol



Girasol	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
LLL	33,2
LLO	31,0
LOO	9,1
LLP	8,5
LOP	5,2

Figura 5. Cromatograma del aceite de girasol

En la composición del aceite de girasol el ácido graso mayoritario es el ácido linoleico (62,8%), seguido del ácido oleico (19%) y ácido palmítico (5,2%). Como se aprecia en la Tabla 9 todas las combinaciones de TG mayoritarias se forman con el ácido graso linoleico.

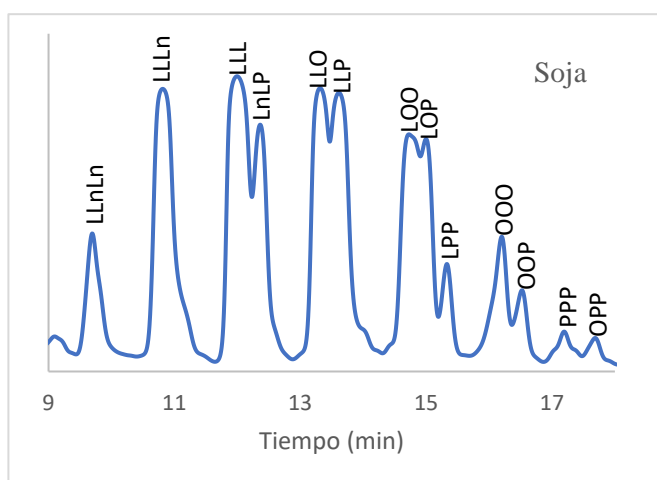
Una vez se ha identificado que el triglicérido OOO va acompañado del OOP (Figura 4), se puede utilizar esta característica en el resto de los cromatogramas, al igual que ocurre con las posiciones de las señales correspondientes a los patrones.

En esta muestra de aceite, los picos que dan una mayor señal se corresponden con los TG que están formados por ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico. En la Tabla 9, se puede observar que los compuestos LLO, LOO, LLP y LOP tienen las probabilidades teóricas más altas de aparecer en el análisis de la muestra (Figura 5), siendo así unos de los picos con mayor señal que se observan en el cromatograma. En primer lugar, el LLO lo podemos situar entre los patrones LLL y OOO por su ECN siendo este 44 y encontrándose entre el valor 42 correspondiente al LLL y el valor 48 correspondiente al OOO. Además, cuenta con cinco dobles enlaces por lo que dará una señal intensa.

En la Figura 5, se puede observar también la diferente sensibilidad que muestran las distintas moléculas separadas. Si, en el caso del aceite de girasol, nos fijamos en dos TG concretos: LLL y LOO, podemos ver que la diferencia principal entre ambos es el número de dobles enlaces, siendo 6 en el LLL y 4 en el LOO. Sin embargo, al observar las señales correspondientes, se puede comprobar cómo la molécula con mayor número de insaturaciones presenta una menor intensidad, poniendo de manifiesto la relativa baja sensibilidad de detección para el triglicérido LLL en comparación con el LOO que presenta menor número de dobles enlaces y que se encuentra con una menor probabilidad.

En tercer lugar, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de soja.

Tabla 10. Probabilidades para el aceite de soja



Soja	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
LLO	20,9
LLL	15,0
LLP	9,8
LOO	9,2
LOP	9,0
LLLn	6,1

Figura 6. Cromatograma del aceite de soja

En primer lugar, se han identificado los patrones al igual que en el resto de los cromatogramas expuestos en el apartado de resultados y posteriormente se ha pasado a identificar el resto de los picos a partir del cálculo del ECN y las probabilidades teóricas. El ácido linoleico es el ácido mayoritario de su composición (48,5%), y como se aprecia en la Tabla 10, este ácido aparece en todas las combinaciones mayoritarias.

Cabe destacar que el aceite de soja se diferencia del resto de los aceites estudiados por ser el que contiene el mayor porcentaje de ácido linolénico, siendo este un 6,4%. Por este motivo, se ha realizado el cálculo de las posibles combinaciones teniendo en consideración el ácido linolénico como un quinto ácido graso disponible para la formación de TG.

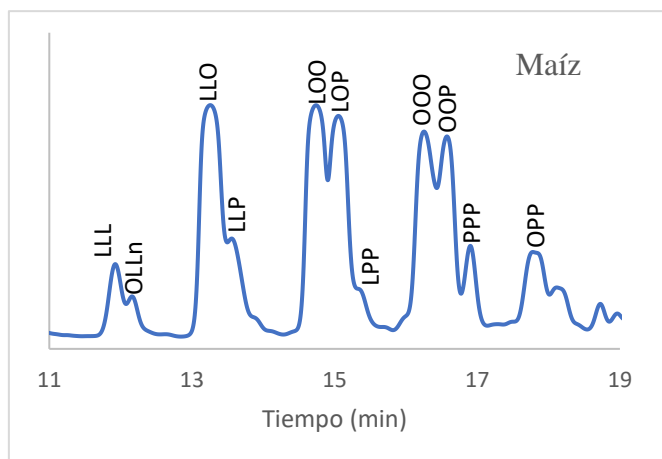
En la Tabla 10 se observa que, debido a que el aceite de soja es el que tiene un mayor contenido en ácido linolénico, este ácido graso también aparece en una de las combinaciones con mayor probabilidad teórica de aparición de los triglicéridos individuales en las composiciones específicas para cada aceite.

El triglicérido LLLn presenta un ECN menor al del patrón LLL, siendo este valor de 40 frente 42. Por ello, el LLLn tendrá un tiempo de retención menor y saldrá al inicio del cromatograma. Además, en su estructura molecular hay siete dobles enlaces por lo que dará una señal de interacción con la radiación ultravioleta significativa.

Otro pico importante en este aceite es el LLnLn, formado por una molécula de ácido linoleico y dos de ácido linolénico, que presenta el menor valor de ECN del cromatograma (38) y ocho dobles enlaces por lo que debe de dar un pico con una altura significativa. Estos dos factores permiten la identificación del LLnLn en el primer pico de la Figura 6.

En cuarto lugar, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de maíz.

Tabla 11. Probabilidades para el aceite de maíz



Maíz	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
LLO	29,3
LLL	17,4
LOO	15,6
LOP	11,6
LLP	10,5

Figura 7. Cromatograma del aceite de maíz

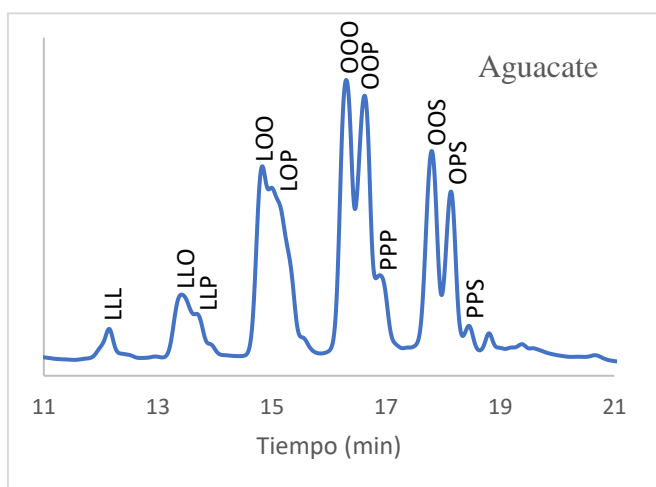
En cuanto a su composición el aceite de maíz, en orden decreciente, presenta los tres ácidos grasos que se dan en todas las combinaciones mayoritarias expuestas en la Tabla 11. Siendo estos el ácido linoleico (52,25%), ácido oleico (28,45%) y ácido palmítico (10,25%).

Como se puede observar en la Figura 7, los picos con una mayor señal (LLO, LOO y LOP) contienen el ácido graso mayoritario: ácido linoleico. El triglicérido LLO tiene el menor valor de ECN entre estos tres triglicéridos, por ello aparecerá en primer lugar. Además, está formado por dos ácidos linoleicos y un ácido oleico sumando así 5 dobles enlaces, lo que dará la mayor absorbancia en la región de UV estudiada. Los otros dos triglicéridos (LOO y LOP) comparten el mismo valor de ECN (46), y mayor que el del LLO, por lo que tendrán un tiempo de retención mayor. Además, tienen cuatro y tres dobles enlaces respectivamente por lo que el LOO se corresponde con el pico más alto y el LOP con el pico siguiente.

Aunque con una menor probabilidad (3,1%), otro de los compuestos con una señal significativa es el OOP. Este TG tiene el mismo valor de ECN (48) que el OOO (2,6%), por ello saldrán con un tiempo de retención similar, y gracias a los dobles enlaces se puede conocer que el que da una menor señal es el OOP, que cuenta con dos dobles enlaces en su estructura molecular, frente al OOO, que cuenta con uno más, correspondiéndose así al pico de mayor intensidad. Por otro lado, el triglicérido OPP (1,0%), da lugar a una señal sensiblemente menor, debido que el ácido palmítico no presenta ningún doble enlace en su composición, y muestra una respuesta muy inferior a la mostrada por los triglicéridos OOO y OOP.

En quinto lugar, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de aguacate.

Tabla 12. Probabilidades para el aceite de aguacate



Aguacate	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
OOO	29,4
OOP	29,6
LOO	14,4
LOP	9,5
OPP	9,3

Figura 8. Cromatograma del aceite de aguacate

El aceite de aguacate es similar en composición al aceite de oliva, siendo el ácido mayoritario el ácido oleico (62%). Por ello los cromatogramas son equivalentes. En la Tabla 12 se muestran las probabilidades teóricas mayoritarias de aparición que están formadas por los tres ácidos grasos mayoritarios de su composición: oleico, palmítico y linoleico.

En la Figura 8 se logran identificar además las señales relativas a SOO, OPS y PPS, aunque estos tengan probabilidades teóricas de aparición bajas (1,2, 0,8 y 0,1% respectivamente). Esto se debe a que, en aceites vegetales con un mayor peso del ácido esteárico en su composición, como puede ser el aceite de palma o el aceite de soja, estos picos se pueden identificar con relativa facilidad, Y una vez identificados los tiempos de retención de estos triglicéridos es posible la identificación de estos en aceites vegetales en los cuales tiene un menor peso en su composición.

La identificación de estos tres triglicéridos con ácido esteárico en su estructura se realiza fundamentalmente con el ECN. Así, el triglicérido formado por tres ácidos palmíticos tiene un ECN de 48 y un tiempo de retención de 17 minutos (en las condiciones de análisis descritas previamente). Por ello los picos que tengan un tiempo de retención mayor que 17, se corresponden con un ECN mayor que 48. Y este es el caso de los triglicéridos formados por uno o varios ácidos grasos esteáricos. Estos triglicéridos se pueden ordenar en base a su ECN de forma creciente: con valores de ECN de 50 nos encontramos el OOS, LSS, OPS y PPS. Los triglicéridos LSS y PPS tienen una probabilidad de aparición teórica muy baja (nula y 0,1% respectivamente) y por ello se descartan para la asignación de señales, quedando así únicamente dos triglicéridos (OOS y OPS). Para saber qué pico corresponde a cada triglicérido, hay que basarse en los dobles enlaces de su estructura y se concluye que el OOS corresponde al pico más grande ya que tiene dos dobles enlaces y el OPS corresponde al pico menor debido a que solo tiene un doble enlace que viene del ácido oleico.

Al mismo tiempo, estos cromatogramas se pueden comparar con estudios previamente realizados por otros autores. Holčapek *et al.*, publicaron en 2003 un trabajo sobre la caracterización de triacilglicéridos y diacilglicéridos de distintos aceites vegetales mediante HPLC-espectrometría de masas por ionización. En este trabajo se ha desarrollado un método HPLC-APCI-MS de alta

resolución que permite la separación e identificación de TGs con idénticos ECNs. Con este método se consiguen separar claramente casi todos los TG con el mismo ECN, gracias a la optimización de las condiciones de trabajo, consiguiendo obtener suficiente espacio en el cromatograma para la separación completa y la identificación inequívoca de los TGs (Holčapek et al., 2003).

En el trabajo de Holčapek se analizan aceites vegetales como el aceite de avellana que tiene una composición similar al aceite de oliva o el de aguacate pudiendo así comparar los cromatogramas obtenidos en este trabajo y descritos anteriormente.

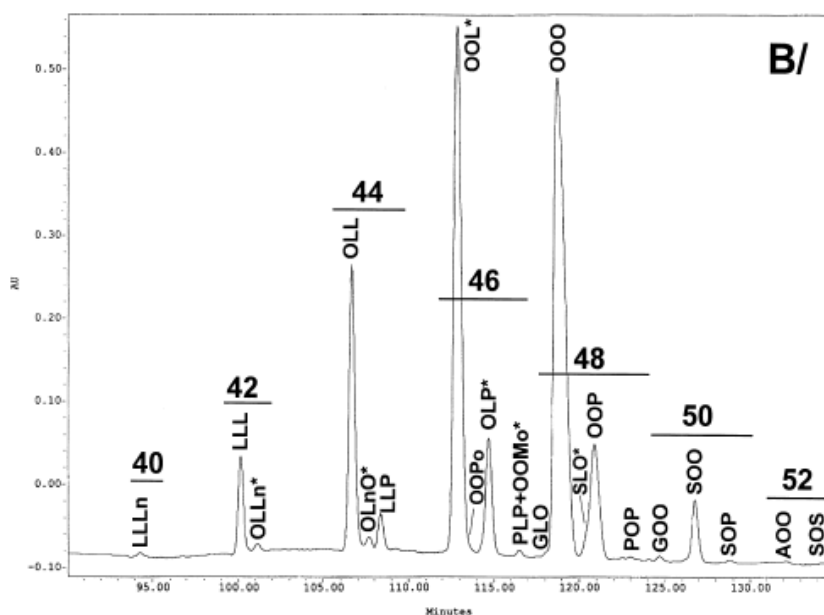


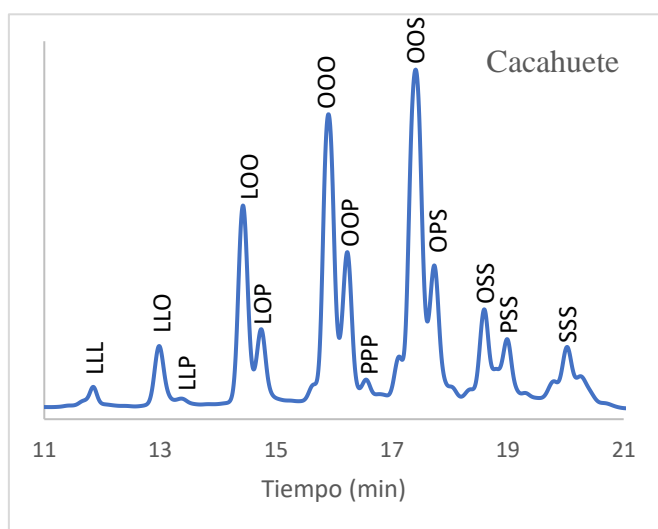
Figura 9. Cromatograma del aceite de avellana (Holčapek et al., 2003).

En la Figura 9 se puede apreciar una mejor separación de los compuestos, empleando largos tiempos de análisis. Mientras que en el trabajo de Holčapek se trabaja con tiempos de análisis superiores a 130 minutos, en este trabajo de investigación, el tiempo de análisis es muy inferior. No obstante, si se comparan los cromatogramas de ambos trabajos, se observa que los triglicéridos siguen el mismo orden de elución.



En sexto lugar, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de cacahuete.

Tabla 13. Probabilidades para el aceite de cacahuete



Cacahuete	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
LOO	27,8
LLO	15,9
OOO	15,4
LOP	11,9
OOP	10,1

Figura 10. Cromatograma del aceite de cacahuete

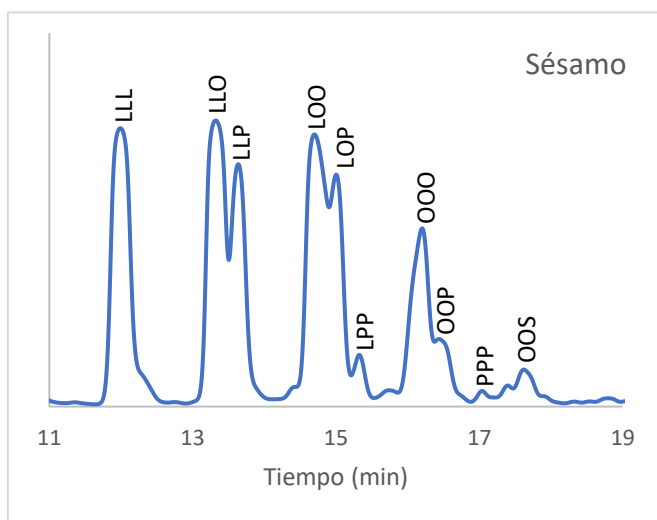
En la composición del aceite de cacahuete destaca el ácido oleico como ácido mayoritario (47,5%) y el ácido linoleico con un 27,6%. Pese a esto, en la Figura 10 se aprecia que se han logrado identificar TGs formados con ácido esteárico pese a tener este un peso específico minoritario en su composición (2,8%).

Los primeros picos anteriores el patrón de la tripalmitina (PPP) se identifican gracias al trabajo de identificación y asignación de los tiempos de retención del resto de cromatogramas previamente descritos.

En este cromatograma, y gracias al ECN, se han conseguido identificar triglicéridos formados por ácido esteárico que no aparecen en el resto de los aceites vegetales estudiados. De la misma forma que en el aceite de aguacate, para tiempos de retención superior a 17 min (PPP), se descartan los triglicéridos LSS y PSS con probabilidad de aparición teórica de 0,1% y se asigna la siguiente señal más intensa al OOS (con tiempo de retención de 17,4 min y 2 dobles enlaces) y al OPS la de menor intensidad (17,73 min). Por otro lado, con valores de ECN de 52 existen las siguientes combinaciones de ácidos grasos, OOS y PSS; y por último, con el valor de ECN superior se encuentra el SSS, siendo éste de 57. Por ello el triglicérido SSS (que pese a tener una probabilidad teórica muy baja) será el último en aparecer en el cromatograma, es decir, tiene el mayor tiempo de retención.

En séptimo lugar, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de sésamo.

Tabla 14. Probabilidades para el aceite de sésamo



Sésamo	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
LLO	23,7
LOO	23,7
LOP	10,9
LLL	7,5
OOO	7,5

Figura 11. Cromatograma del aceite de sésamo

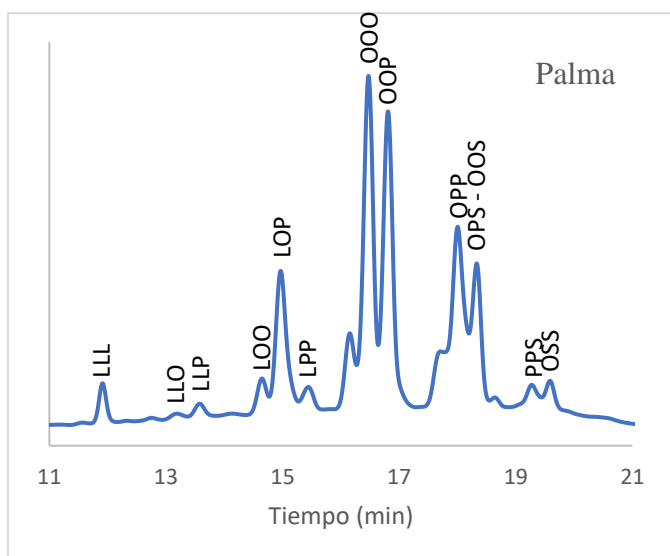
En la composición del aceite de sésamo nos encontramos en rangos iguales el ácido oleico y el ácido linoleico (35-50%) dependiendo del aceite estudiado. Por ello las combinaciones mayoritarias de los TGs que se muestran en la Tabla 14 tienen que estar formadas por estos dos ácidos grasos con otros minoritarios como pueden ser el ácido palmítico con un 7-12%.

Como se puede observar, los picos con una mayor señal (LLL, LLO, LLP, LOO y LOP) contienen uno de los ácidos grasos mayoritarios, ácido linoleico. Una vez identificado el LLL igual que en las muestras anteriores, el triglicérido LLO tiene el menor valor de ECN por ello aparecerá en segundo lugar (tras LLL). Además, está formado por dos ácidos linoleicos y un ácido oleico sumando así 5 dobles enlaces por lo que dará la mayor absorbancia en la región de UV estudiada. Los siguientes dos triglicéridos de la Tabla 14 (LOO y LOP) comparten el mismo valor de ECN (46), siendo este mayor que el del TG LLO, por lo que tendrán un tiempo de retención mayor. Estos TG tienen cuatro y tres dobles enlaces respectivamente, por lo que el LOO se corresponde con el pico más alto y el LOP con el pico siguiente.

Además, cabe destacar que, igual que se observó en el resto de los cromatogramas estudiados, los TG LLO y LLP se identifican conjuntamente al igual que el LOO y LOP, sin que llegue a existir una separación total de las señales en los cromatogramas obtenidos, y resultando una señal doble en cada una de las parejas de TG comentadas.

Por último, se muestra el cromatograma y el cálculo teórico de probabilidades correspondiente a la muestra de aceite de palma.

Tabla 15. Probabilidades para el aceite de palma



Palma	
Triacilglicérido	Probabilidad (%)
OPP	19,8
OOP	18,2
LOP	15,5
LPP	8,2
LOO	6,9
PPP	6,8

Figura 12. Cromatograma del aceite de palma

El aceite de palma tiene principalmente dos ácidos grasos mayoritarios: ácido palmítico (38,84%) y ácido oleico (35,79%). Estos dos ácidos grasos varían su proporción dependiendo del aceite de palma estudiado. Cabe destacar que el aceite de palma se diferencia de los aceites previamente estudiados por ser el que contiene el mayor porcentaje de ácido esteárico, siendo este un 4,25%. Por ello en este cromatograma se procede a la identificación de los diferentes TGs formados por este ácido graso. En la Tabla 6 se puede observar que los TGs con ácido esteárico poseen ECN mayores por lo que serán los últimos en aparecer en el cromatograma.

Llama la atención que siendo el ácido palmítico el ácido graso mayoritario en su composición el triglicérido PPP (6,8%) no aparece en la Figura 12. Esto probablemente se debe a que la señal del OOP es tan intensa y ancha debido a la presencia de dos dobles enlaces que no permite que se aprecie el pico del PPP que debería de aparecer en tiempos de retención cercanos a 17 min. Modificando las condiciones de análisis o incluso la columna de cromatografía se podría lograr separar de manera más eficaz los picos relativos a cada compuesto, y quizá así se podría obtener una señal individual y separada del resto para el triglicérido PPP.

Otro pico en el que hay que hacer hincapié en la Figura 12 es la señal que está identificada con dos triglicéridos diferentes (OPS y OOS). Esta identificación no se ha podido concretar porque ambos compuestos cuentan con un valor de ECN de 50 y ambos tienen una probabilidad teórica baja, de 4,4% en el caso del OPS y 2% en el caso del OOS. Con esta información y teniendo en cuenta que el triglicérido OPS cuenta con un doble enlace menos que el OOS no es posible identificar este pico y asignarle un TG concreto.

#### 4.4. Aplicación en la industria alimentaria

Como aplicación del análisis de triglicéridos mediante HPLC en muestras de aceites vegetales, se estudia la composición de aceites vegetales empleados para la elaboración de conservas alimentarias. Las conservas son productos obtenidos a partir de alimentos perecederos de origen animal o vegetal con o sin adición de otras sustancias autorizadas, contenidos en envases apropiados herméticamente cerrados tratados exclusivamente por el calor, en forma que asegure su composición (BOE, 1967).

Para que sea más sencillo analizar y comparar la composición de los aceites de las conservas estudiadas, a continuación, se representan los cromatogramas de las muestras de conserva junto al respectivo cromatograma del aceite vegetal al que hace referencia.

En primer lugar, se analiza una conserva de atún claro en aceite de oliva, la cual en su lista de ingredientes declara que contiene atún claro (*Thunnus albacares*), aceite de oliva 24,2% y sal.

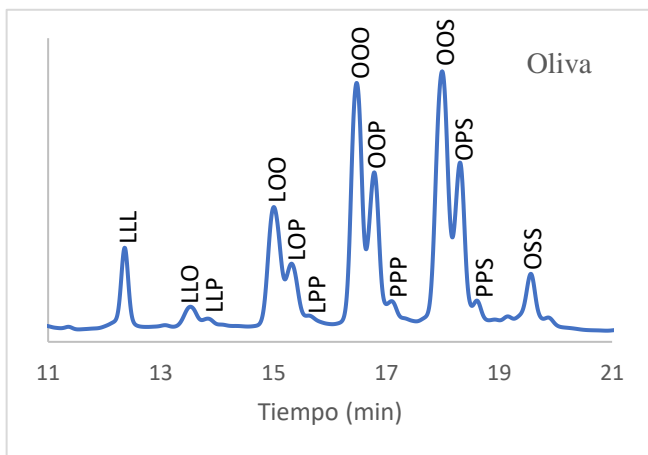


Figura 14. Cromatograma del aceite de oliva

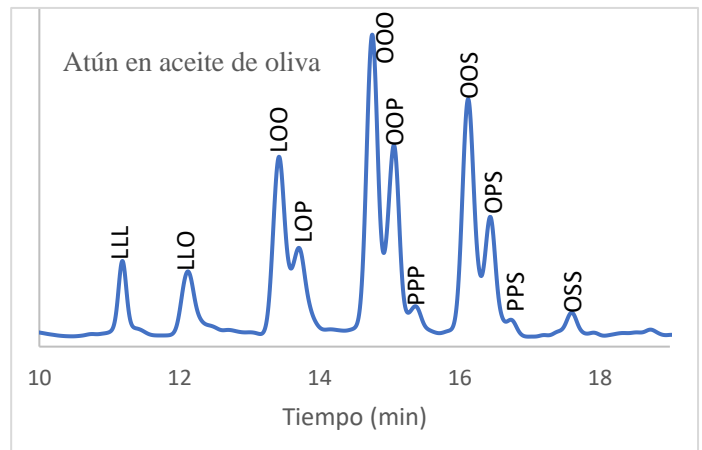


Figura 13. Cromatograma del aceite de oliva de una conserva de atún

Comparando la Figura 14 correspondiente al aceite de oliva, con la Figura 13 que resulta del análisis del aceite de oliva de la conserva de atún, se puede observar que coinciden todos los triglicéridos identificados, mostrando un patrón muy similar en ambos casos.

La principal diferencia entre los dos cromatogramas está en las proporciones que se observan de cada triglicérido, especialmente en el caso del OOS y el OPS, que disminuyen notablemente su señal en la muestra de la conserva de atún con respecto al aceite de oliva previamente analizado. Asimismo, en la muestra de conserva, se aprecia un notable aumento en la señal correspondiente al TG LLO a la vez que el OSS disminuye en intensidad. Esto puede estar ocasionado por pequeñas diferencias en la composición del aceite empleado variando ligeramente según el tipo de aceite empleado, zona de producción, características tecnológicas de producción, o incluso variedad de aceituna (Tabla 16), como se recoge en documentos de la bibliografía específica (Civantos et al., 1999; de la Osada García, 2010).

Tabla 16. Porcentaje de ácidos grasos oleico y linoleico en distintas variedades de aceituna

Varietades	Ácido oleico (%)	Ácido linoleico (%)
Picual	78,3	5,1
Hojiblanca	75,7	9,2
Cornicabra	80,3	5,6
Arbequina	70,2	11,4
Empeltre	74,6	9,4

En segundo lugar, se analiza una conserva de sardinas en aceite de girasol, la cual en su etiqueta expone que contiene únicamente sardinas (*Sardina pilchardus Walbaum*), aceite de girasol y sal. Además, indica que puede contener crustáceos.

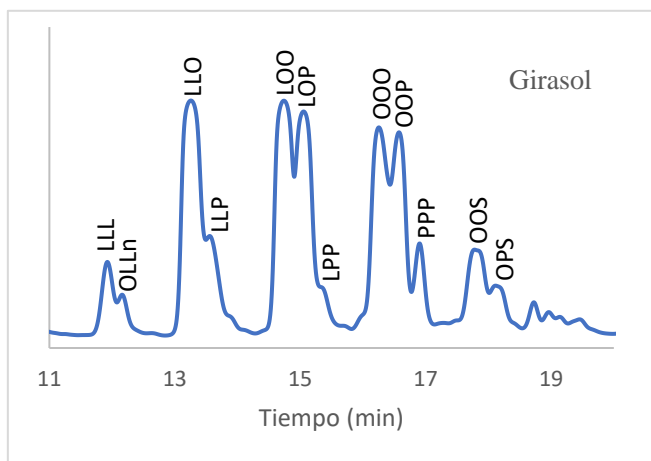


Figura 15. Cromatograma del aceite de girasol

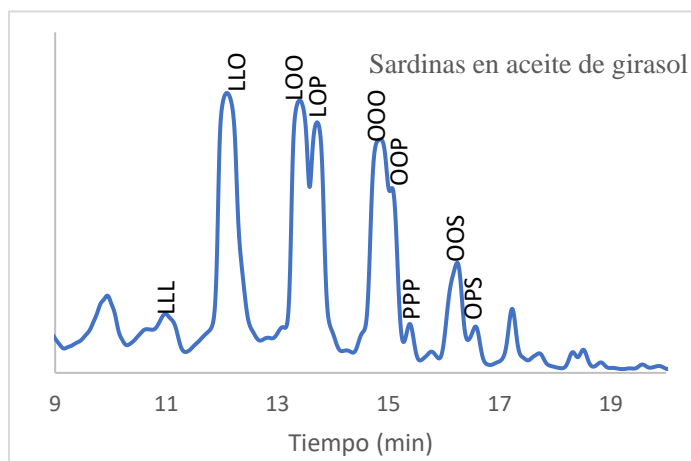


Figura 16. Cromatograma del aceite de girasol de una conserva de sardinas

Al igual que en el caso anterior se muestra el cromatograma obtenido para el aceite de referencia, en este caso aceite de girasol. Comparando la Figura 15 con la Figura 16, se observa que los cromatogramas siguen una distribución muy similar. Aunque cabe destacar que en este caso se logra identificar un número menor de triglicéridos en la muestra de sardinas en aceite de girasol, principalmente motivado por la anchura de las señales, que no permiten una total separación de los picos más pequeños.

Las diferencias que se observan entre los cromatogramas se pueden deber al proceso de elaboración de la conserva. Este proceso implica una gran diversidad de procesos y tratamientos que conllevan a la formación de gran cantidad de metabolitos que interfieren en la calidad final a largo plazo del producto (Aubourg, 2001).

## 5. Conclusiones

La cromatografía líquida, y más concretamente la cromatografía HPLC, destaca especialmente como una de las técnicas más habituales empleadas en el análisis de múltiples alimentos y productos alimentarios. En este sentido, las posibilidades que presenta la técnica son muy numerosas, lográndose aplicaciones muy diversas dependiendo de los elementos que se seleccionen para el trabajo, especialmente la columna de separación y el detector.

En este trabajo, se utiliza una instalación de HPLC equipada con una columna cromatográfica de fase estacionaria C18 que hace posible separar correctamente los triglicéridos mayoritarios que se encuentran en muestras de aceite vegetales.

Como sistema de detección, se trabaja en el rango del espectro UV con el empleo de un detector de longitud de onda variable que permite obtener diferentes intensidades de señal para diferentes moléculas orgánicas, que fundamentalmente se diferencian entre sí en el número de carbonos y en el número y posición de insaturaciones o dobles enlaces.

El método de trabajo consiste en un método de HPLC en gradiente, con una fase móvil formada por mezclas de isopropanol, hexano y acetonitrilo, alimentadas al sistema con un caudal constante de 1 mL/min, mediante una bomba automática que varía la composición de la misma durante el análisis. La temperatura se mantiene constante en un valor de 40 °C, durante los 26 min que dura el análisis, y la longitud de onda seleccionada en el detector es de 205 nm.

El método de análisis de HPLC con detector ultravioleta con el que se ha realizado este trabajo permitió la caracterización de la composición de TGs mayoritarios de muestras de 8 aceites vegetales distintos: aceite de oliva, girasol, soja, maíz, aguacate, cacahuete, sésamo y palma.

Los aceites seleccionados difieren en el contenido de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, mostrando en consecuencia distinta composición de triglicéridos y por ello se pueden observar diferencias significativas en la interacción de las moléculas separadas y la radiación UV, analizadas mediante el uso de un detector de ultravioleta.

Se han analizado las estructuras moleculares de los ácidos grasos mayoritarios en los aceites estudiados: ácido oleico (O), linoleico (L), esteárico (S), palmítico (P) y linolénico (Ln), observando que, en todos los casos salvo el ácido palmítico, la cadena principal de la molécula está formada por 18 átomos de carbono. Además, se identifican el ácido esteárico y el palmítico como ácidos grasos saturados, mientras que el resto muestra al menos un doble enlace en el caso del ácido oleico (ácido graso insaturado), 2 dobles enlaces el ácido linoleico y hasta 3 en el linolénico, definiéndose estos dos últimos como ácidos grasos poliinsaturados.

Una vez definidas las estructuras de las moléculas de los ácidos grasos, se aborda el estudio de las moléculas de triglicérido, formadas mediante la combinación de tres ácidos grasos, iguales o distintos, con el esqueleto del glicerol. Se establece el ECN (Equivalent Carbon Number) como medida de la polaridad de las moléculas y por consecuencia, orden de elución de los compuestos en la columna cromatográfica. Se puede observar cómo hay grupos de TG que coinciden en el valor de ECN, como son: LLLn, LnLnP, con ECN de 40, u OSS y PSS con ECN de 52.

Una vez establecido el orden de elución, y con ayuda de los patrones de TG comerciales disponibles para este trabajo (OOO, LLL, PPP), se logra identificar la mayoría de las señales obtenidas en el análisis de los distintos aceites, trabajando estas asignaciones con el estudio simultáneo de los cromatogramas estudiados, de manera que las señales más apreciables en un

tipo de aceite, permiten la identificación de señales minoritarias en otros. Además, se ha realizado el cálculo probabilístico de las posibles combinaciones de los ácidos grasos en la formación de los correspondientes TG, teniendo en cuenta los 4 ácidos grasos mayoritarios para todos los aceites estudiados, salvo en el caso del aceite de soja, para el que se incluye además el ácido linolénico debido a su relativamente elevado porcentaje en la composición teórica. En este punto, se consideran las posibles combinaciones de 4 o 5 elementos diferentes (los ácidos grasos) en la estructura del TG formado, sin considerar las distintas posibles posiciones relativas de cada uno de ellos en la molécula final.

A partir de la composición teórica en ácidos grasos, se establece una composición en TG para cada uno de los aceites estudiados que obviamente varía conforme lo hace la composición del aceite en cuestión, mostrando como TG mayoritarios los resultantes de la combinación de los ácidos grasos mayoritarios. Estos valores sin embargo no siempre se traducen en señales cromatográficas de mayor intensidad, puesto que la estructura molecular juega un papel importante en la detección, como se ha ido explicando en el apartado de resultados y discusión.

Finalmente, se han analizado dos porciones de aceite contenidas en sendas muestras de conserva de pescado, con el fin de comprobar la posible aplicación del trabajo desarrollado. Tras comparar los resultados del análisis con los aceites de referencia (oliva y girasol) se observa cómo el método seleccionado permite detectar similitudes y diferencias en los alimentos seleccionados, cuya aplicación industrial podría estar relacionada con el control de calidad del procesado de alimentos de este tipo, o incluso con el control o comprobación del correcto etiquetado de alimentos procesados con el objetivo de cumplir la normativa correspondiente.

Como se ha comprobado, el método de análisis ha permitido la correcta separación y asignación del perfil de TG de las muestras de aceite estudiadas. No obstante, para obtener una mejor separación y por tanto una mejor identificación de todos los picos presentes en los distintos cromatogramas, especialmente en las señales dobles que aparecen en las parejas LLO/LOP o OOO/OOP, se debería tratar de optimizar el método experimental. Esto se consigue actuando sobre las principales variables de análisis, logrando un método con probablemente mayor tiempo de análisis como se ha visto en estudios similares como el realizado por Holčapek *et al.*

## 6. Bibliografía

- Análisis de los ácidos grasos contenidos en el aceite de sésamo (*Sesamum indicum*) utilizado como aceite portador (base) en masajes de aromaterapia. (2021, marzo 26). Esoteric Oils. <https://essentialoils.co.za/sesame-oil-analysis.htm>
- Arango Parrado, N. (2011). Análisis de la calidad del aceite de mezclas vegetales utilizado en doce frituras sucesivas empleando para freír papa sabanera tipo francesa [Trabajo Fin de Grado]. Universidad Pontificia Javeriana.
- Arias, T. S. (2019). Determinación de compuestos del aceite de oliva virgen relacionados con enfermedades cancerígenas y neurodegenerativas [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de Sevilla.
- Arroyave, J. F. (2017). Obtención de aceite de aguacate con alto valor agregado para la industria de alimentos usando fluidos supercríticos [Trabajo Fin de Grado]. Universidad Lasallista.
- Aubourg, S. P. (2001). Review: Loss of Quality during the Manufacture of Canned Fish Products. *Food Science and Technology International*, 7(3), 199-215. <https://doi.org/10.1106/4H8U-9GAD-VMG0-3GLR>
- Ayora Cañada, M. J. (s. f.). Tema 6: Técnicas cromatográficas. Recuperado 20 de abril de 2021, de [http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia\\_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf](http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf)
- Azcona, Á. C. (2013). *Manual de Nutrición y Dietética*. 367.
- Baltes, W. (2006). *Química de los alimentos (5ª)*. ACRIBIA, S.A.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2011). *Química de los alimentos (3ª)*. ACRIBIA, S.A.
- Bernal de Ramírez, I. (1998). *Análisis de Alimentos (3ª, Vol. 2)*.
- BOE. (1967). Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. 130.
- BOE. (1983). Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.



- Cabezas-Zábala, C. C., Hernández-Torres, B. C., & Vargas-Zarate, M. (2016). Aceites y grasas: Efectos en la salud y regulación mundial. *Revista de la Facultad de Medicina*, 64(4), 761. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v64n4.53684>
- Carrillo Fernández, L., Dalmau Serra, J., Martínez Álvarez, J., Solà Alberich, R., & Pérez-Jiménez, F. (2011). Grasas de la dieta y salud cardiovascular. *Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria*, 31(2), 6-25.
- Chao Mujica, F. J. (2013). Método teórico para la predicción del índice de refracción en refractometría. *Boletín Científico Técnico INIMET*, 2, 19.
- Chicharro, M., Bautista, A. I., Benayas, A., Yolanda, & Ortiz, A. (s. f.). *Cromatografía principios y aplicaciones*. Recuperado 10 de abril de 2021, de [https://www.academia.edu/19627688/Cromatografia\\_Principios\\_y\\_Aplicaciones](https://www.academia.edu/19627688/Cromatografia_Principios_y_Aplicaciones)
- Civantos, L., Contreras, R., & Grana, R. (1999). Obtención del Aceite de Oliva Virgen (2ª). *Agrícola Española*.
- Cortez Cortez, D. G., & Sánchez Carbajal, E. E. (2017). Evaluación de la estabilidad oxidativa de la mezcla de aceites de chia (*Salvia Hispánica L.*) y ajonjolí (*Sesamum Indicum L.*) [Univerisidad nacional de la Santa Facultad de Ingeniería]. <http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/2985/46311.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- de la Mata-Espinosa, P. (2011). Aplicabilidad de la cromatografía líquida y espectrometría vibracional para desarrollar modelos multivariantes para la detección y cuantificación de aceite de oliva en mezclas de aceites vegetales [Tesis Doctoral]. Editorial de la Universidad de Granada.
- de la Osada García, J. (2010). Aceite de oliva virgen extra y prevención de la aterosclerosis. Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.
- Delucchi, C., Percibaldi, M., Trejo, M., & Eyhérbide, G. (2019). Mejoramiento genético del perfil de ácidos grasos del aceite de maíz. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45(2), 24.

- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., Meléndez-Valdés, F. T., & Fiñana, I. T. (s. f.). 8. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas (p. 8).
- Faraldos, M., & Goberna, C. (2012). Técnicas de análisis y caracterización de materiales (2ª). Consejo superior de investigaciones científicas. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/upnasp-ebooks/reader.action?docID=3196522>
- Fedeli, E. (1977). Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. Lipids of olives, 15(1), 57-74.
- Federación Española de la Nutrición. (s. f.). Aceites y Grasas. <https://www.fen.org.es/storage/app/media/flipbook/mercado-alimentos-fen/005-Aceites-Grasas.pdf>
- Gesteiro, E., Galera-Gordo, J., & González-Gross, M. (2018). Aceite de palma y salud cardiovascular; consideraciones para valorar la literatura. Nutrición Hospitalaria, 35(5), 1229-1242. <http://dx.doi.org/10.20960/nh.1970>
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 1. Introducción a las técnicas instrumentales en el análisis industrial. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8245/8/T1metodos%20instrumen.pdf>
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Gutiérrez Álvarez, B. A. (2003). Descripción y fundamento de los análisis del aceite [Profesional, Universidad de las Américas Puebla]. <https://bchem.files.wordpress.com/2010/10/descripcion-fundamentos-analisis-aceite.pdf>
- Holčapek, M., Jandera, P., Fischer, J., & Prokes, B. (1999). Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. Journal of Chromatography A, 858, 13-31. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00790-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00790-6)
- Holčapek, M., Jandera, P., Zderadicka, P., & Hrubá, L. (2003). Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plants oils using high-performance liquis

- chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1010(2), 195-215. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01030-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01030-6)
- Holčapek, M., Lisa, M., Jandera, P., & Kabátová, N. (2005). Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection. *Journal of Separation Science*, 28(12), 1315-1333. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500088>
- Komaram, A. C., Anjaneyulu, E., Goswami, K., Nayak, R. R., & Kanjilal, S. (2021). Detection and quantification of palmolein and palm kernel oil added as adulterant in coconut oil based on triacylglycerol profile. *Journal Food Sci Technol*. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04927-z>
- Lopez, M. A. (2017, octubre 5). Estudios: El 45% de los consumidores quiere alimentos con más propiedades saludables | América Retail. América Retail. <https://www.america-retail.com/estudios/estudios-el-45-de-los-consumidores-quiere-alimentos-con-mas-propiedades-saludables/>
- Loyola López, N., López Acevedo, R., & Acuña Carrasco, C. (2008). Evaluación sensorial y analítica de la calidad de aceite de oliva extravirgen. *Idesia (Arica)*, 26(2), 18. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292008000200005>
- MAPAMA. (2020). Informe del consumo de alimentación en España 2019 (p. 674). [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe2019\\_v2\\_tcm30-540250.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe2019_v2_tcm30-540250.pdf)
- Murcia, J. L. (2016). La preocupación por la salud y la curiosidad marcan tendencia en la alimentación. *Distribución y consumo*, 1, 7.
- Novartis Medical Nutrition. (s. f.). Tabla de composición de alimentos.
- Panreac Química. (s. f.). Analíticos en alimentaria (Aceites y grasas) [Métodos oficiales de análisis]. Panreac Química.
- Parras-Rosa, M. (2001). El comportamiento del consumidor y la demanda de aceites vegetales en España: Oliva virgen versus oliva/girasol. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 192, 161-193. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.165075>

- Pérez Rosales, R., Villanueva Rodríguez, S., & Cosío Ramírez, R. (2005). El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *e-Gnosis*, 3(0), 12.
- Perona, J. S., Ruiz-Gutiérrez, V., & Barrón, L. J. R. (1999). La cromatografía líquida de alta eficacia en la separación de triglicéridos de grasas animales complejas. *Grasas y Aceites*, 50(4), 298-311. <https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i4.671>
- Rincón, S. M., & Martínez, D. M. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *Revistas Palmas*, 30(2), 11-24.
- Rivera, Y., Gutiérrez, C., Gómez, R., Matute, M., & Izaguirre, C. (2014). Cuantificación del deterioro de aceites vegetales usados en procesos de frituras en establecimientos ubicados en el Municipio Libertador del Estado Mérida. *Ciencia e Ingeniería*, 35(3), 157-164.
- Ros, E. (s. f.). Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta. *Federación Española de Sociedades de Nutrición y Dietética*, 80.
- Rouessac, F., Rouessac, A., & Ourisson, G. (2003). Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas (bupn.00183459; Traducción de la 5ª). Biblioteca Universidad Pública de Navarra. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat03043a&AN=bupn.00183459&site=eds-live>
- Sgariglia, Araceli, M., Soberón, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). Cromatografía: Conceptos y aplicaciones. *Revista Arakuku*, 6.
- Unión Europea. (2011). Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre el suministro de información alimentaria a los consumidores, que modifica los Reglamentos (CE) n° 1924/2006 y (CE) n° 1925/2006 de del Parlamento Europeo y del Consejo, y por la que se deroga la Directiva 87/250 / CEE de la Comisión, la Directiva 90/496 / CEE del Consejo, la Directiva 1999/10 / CE de la Comisión, la Directiva 2000/13 / CE del Parlamento Europeo y del Consejo, la Comisión Directivas 2002/67 / EC y 2008/5 / EC y Reglamento de la Comisión (EC) N° 608/2004. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02011R1169-20180101&from=EN>

Vilar, J. (2020, abril 17). En España se consumen más de 1,2 millones de toneladas de aceites y grasas en el plano alimentario. JUAN VILAR CONSULTOR ESTRATEGICO.  
<https://www.juanvilar.com/en-espana-se-consumen-mas-de-12-millones-de-toneladas-de-aceites-y-grasas-en-el-plano-alimentario/>

## 7. Anexos

### Anexo I. Tabla composición de los aceites empleados

Tabla 1. Composición de los aceites empleados en el trabajo. Adaptada de (Arroyave, 2017) (Gesteiro et al., 2018) (Análisis de los ácidos grasos contenidos en el aceite de sésamo (*Sesamum indicum*) utilizado como aceite portador (base) en masajes de aromaterapia., 2021) (Novartis Medical Nutrition, s. f.).

Ácidos grasos	Ac. Grasos saturados (g)	C 14:0 (g) Ácido mirístico Ac. tetradecanoico	C 16:0 (g) Ácido palmítico Ac. hexadecanoico	C 18:0 (g) Ácido esteárico Ac. Octadecanoico	Ac G. Mono insaturados (g)	C 16:1 (g) Ácido palmítico	C 18:1 (9) (g) Ácido oleico	Ac G. Poliinsaturados (g)	C 18:2 (9, 12) (g) Ácido linoleico	C 18:3 (9, 12, 15) Ácido α-Linolénico (ALA)	Estructura
Aceite de cacahuete	18,3	0,02	10	2,8	49	0,2	47,5	27,8	27,6	0,1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Aceite de girasol	9	ND	5,2	3,3	20	0,6	19	62,8	62,8	ND	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Aceite de maíz	12,9	0	10,25	2,15	28,95	0,5	28,45	53,18	52,25	0,93	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Aceite de oliva	14	ND	10,8	2,8	72	1,05	70,4	9,2	8,6	0,6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Aceite de soja	14,3	0,15	10,2	3,7	22	0,3	21,8	55	48,5	6,4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Aceite de aguacate	16-25	0	16-25	0,1-1,5	62-74	4-6	58-68	7-13	7-13	0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Aceite de palma	44,7	1,12	38,84	4,25	40,22	4,25	35,79	14,99	14,77	0,22	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Aceite de sésamo	10,5-18	0	7-12	3,5-6	35-50	traza	35-50	35-50	35-50	traza	

\*ND: No disponible

## Anexo II. Tablas de cálculo de probabilidades teóricas de aparición de los distintos TGs

Tabla 1. Composición normalizada del aceite de oliva

	Aceite de oliva	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)
Composición	Normalizada	9,3	76,0	11,7	3,0

Tabla 2. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de oliva

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1ª	2ª	3ª				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	5,61E+02	1	1,69E+05	<b>0,1%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	5,85E+03	3	2,84E+05	<b>1,8%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	8,98E+02	3	1,02E+05	<b>0,3%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	2,33E+02	3	2,15E+04	<b>0,1%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	5,30E+04	3	1,52E+05	<b>16,4%</b>
6	<b>LOP</b>	1	2	3	8,23E+03	6	1,13E+05	<b>5,1%</b>
7	<b>LOS</b>	1	2	4	2,13E+03	6	2,37E+04	<b>1,3%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	1,16E+03	3	1,85E+04	<b>0,4%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	3,28E+02	6	8,53E+03	<b>0,2%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	5,68E+01	3	5,06E+02	<b>0,0%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	4,22E+05	1	2,56E+04	<b>43,5%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	6,65E+04	3	2,96E+04	<b>20,6%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	1,72E+04	3	6,21E+03	<b>5,3%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	9,45E+03	3	1,00E+04	<b>2,9%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	2,68E+03	6	4,62E+03	<b>1,7%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	4,65E+02	3	2,74E+02	<b>0,1%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	1,20E+03	1	9,84E+02	<b>0,1%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	3,76E+02	3	7,57E+02	<b>0,1%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	7,14E+01	3	9,89E+01	<b>0,0%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	6,26E+00	1	9,10E-01	<b>0,0%</b>
						64	970200	<b>100,0%</b>

Tabla 3. Composición normalizada del aceite de girasol

	Aceite de girasol	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)
Composición	Normalizada	69,6	21,0	5,8	3,6

Tabla 4. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de girasol

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	3,22E+05	1	3,22E+05	<b>33,2%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	1,00E+05	3	3,01E+05	<b>31,0%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	2,75E+04	3	8,24E+04	<b>8,5%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	1,74E+04	3	5,23E+04	<b>5,4%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	2,93E+04	3	8,80E+04	<b>9,1%</b>
6	<b>LOP</b>	1	2	3	8,43E+03	6	5,06E+04	<b>5,2%</b>
7	<b>LOS</b>	1	2	4	5,35E+03	6	3,21E+04	<b>3,3%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	1,91E+03	3	5,72E+03	<b>0,6%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	1,46E+03	6	8,78E+03	<b>0,9%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	6,75E+02	3	2,02E+03	<b>0,2%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	8,03E+03	1	8,03E+03	<b>0,8%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	2,43E+03	3	7,28E+03	<b>0,8%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	1,54E+03	3	4,62E+03	<b>0,5%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	5,77E+02	3	1,73E+03	<b>0,2%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	4,43E+02	6	2,66E+03	<b>0,3%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	2,04E+02	3	6,12E+02	<b>0,1%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	1,03E+02	1	1,03E+02	<b>0,0%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	1,00E+02	3	3,00E+02	<b>0,0%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	5,59E+01	3	1,68E+02	<b>0,0%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	1,60E+01	1	1,60E+01	<b>0,0%</b>
						64	970200	<b>100,0%</b>



Tabla 5. Composición normalizada del aceite de maíz

	Aceite de maíz	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)
Composición	Normalizada	56,2	30,5	11,0	2,3

Tabla 6. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de maíz

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1ª	2ª	3ª				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	1,69E+05	1	1,81E+05	<b>17,4%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	9,47E+04	3	2,53E+05	<b>29,3%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	3,41E+04	3	1,18E+05	<b>10,5%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	7,16E+03	3	4,30E+04	<b>2,2%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	5,05E+04	3	1,11E+05	<b>15,6%</b>
6	<b>LOP</b>	1	2	3	1,88E+04	6	1,08E+05	<b>11,6%</b>
7	<b>LOS</b>	1	2	4	3,95E+03	6	3,93E+04	<b>2,4%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	6,16E+03	3	2,33E+04	<b>1,9%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	1,42E+03	6	1,84E+04	<b>0,9%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	1,69E+02	3	2,58E+03	<b>0,1%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	2,56E+04	1	1,54E+04	<b>2,6%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	9,86E+03	3	2,34E+04	<b>3,1%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	2,07E+03	3	8,50E+03	<b>0,6%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	3,34E+03	3	1,05E+04	<b>1,0%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	7,71E+02	6	8,27E+03	<b>0,5%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	9,15E+01	3	1,16E+03	<b>0,0%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	9,84E+02	1	1,36E+03	<b>0,1%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	2,52E+02	3	1,77E+03	<b>0,1%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	3,30E+01	3	5,42E+02	<b>0,0%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	9,10E-01	1	3,57E+01	<b>0,0%</b>
						64	970200	<b>100,0%</b>

Tabla 7. Composición normalizada del aceite de aguacate

	Aceite de aguacate	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)
Composición	Normalizada	10,6	66,8	21,7	0,9

Tabla 8. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de aguacate

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	8,8E+02	1	8,76E+02	<b>0,1%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	6,8E+03	3	2,04E+04	<b>2,1%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	2,2E+03	3	6,64E+03	<b>0,7%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	8,6E+01	3	2,59E+02	<b>0,0%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	4,7E+04	3	1,40E+05	<b>14,4%</b>
6	<b>LOP</b>	1	2	3	1,5E+04	6	9,24E+04	<b>9,5%</b>
7	<b>LOS</b>	1	2	4	6,0E+02	6	3,61E+03	<b>0,4%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	4,8E+03	3	1,43E+04	<b>1,5%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	2,0E+02	6	1,17E+03	<b>0,1%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	-1,4E+00	3	-4,09E+00	<b>0,0%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	2,8E+05	1	2,85E+05	<b>29,4%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	9,6E+04	3	2,87E+05	<b>29,6%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	3,7E+03	3	1,12E+04	<b>1,2%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	3,0E+04	3	9,04E+04	<b>9,3%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	1,2E+03	6	7,39E+03	<b>0,8%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	-8,6E+00	3	-2,58E+01	<b>0,0%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	8,9E+03	1	8,90E+03	<b>0,9%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	3,8E+02	3	1,15E+03	<b>0,1%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	-2,8E+00	3	-8,39E+00	<b>0,0%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	1,5E-01	1	1,48E-01	<b>0,0%</b>
						64	970200	<b>100,0%</b>

Tabla 9. Composición normalizada del aceite de cacahuete

	Aceite de cacahuete	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)
Composición	Normalizada	31,4	54,0	11,4	3,2

Tabla 10. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de cacahuete

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	2,81E+04	1	2,81E+04	<b>2,9%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	5,16E+04	3	1,55E+05	<b>15,9%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	1,09E+04	3	3,26E+04	<b>3,4%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	3,04E+03	3	9,12E+03	<b>0,9%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	9,00E+04	3	2,70E+05	<b>27,8%</b>
6	<b>LOP</b>	1	2	3	1,93E+04	6	1,16E+05	<b>11,9%</b>
7	<b>LOS</b>	1	2	4	5,40E+03	6	3,24E+04	<b>3,3%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	3,71E+03	3	1,11E+04	<b>1,1%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	1,14E+03	6	6,83E+03	<b>0,7%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	2,19E+02	3	6,56E+02	<b>0,1%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	1,49E+05	1	1,49E+05	<b>15,4%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	3,26E+04	3	9,78E+04	<b>10,1%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	9,13E+03	3	2,74E+04	<b>2,8%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	6,38E+03	3	1,91E+04	<b>2,0%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	1,96E+03	6	1,17E+04	<b>1,2%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	3,76E+02	3	1,13E+03	<b>0,1%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	1,11E+03	1	1,11E+03	<b>0,1%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	3,76E+02	3	1,13E+03	<b>0,1%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	7,92E+01	3	2,38E+02	<b>0,0%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	8,25E+00	1	8,25E+00	<b>0,0%</b>
						64	970200	<b>100,0%</b>

Tabla 11. Composición normalizada del aceite de sésamo

	Aceite de sésamo	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)
Composición	Normalizada	42,8	42,8	9,6	4,8

Tabla 12. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de sésamo

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1ª	2ª	3ª				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	7,31E+04	1	7,31E+04	<b>7,5%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	7,67E+04	3	2,30E+05	<b>23,7%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	1,71E+04	3	5,14E+04	<b>5,3%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	8,57E+03	3	2,57E+04	<b>2,7%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	7,67E+04	3	2,30E+05	23,7%
6	<b>LOP</b>	1	2	3	1,76E+04	6	1,05E+05	10,9%
7	<b>LOS</b>	1	2	4	8,78E+03	6	5,27E+04	<b>5,4%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	3,51E+03	3	1,05E+04	<b>1,1%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	1,96E+03	6	1,18E+04	<b>1,2%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	7,76E+02	3	2,33E+03	<b>0,2%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	7,31E+04	1	7,31E+04	<b>7,5%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	1,71E+04	3	5,14E+04	<b>5,3%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	8,57E+03	3	2,57E+04	<b>2,7%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	3,51E+03	3	1,05E+04	<b>1,1%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	1,96E+03	6	1,18E+04	<b>1,2%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	7,76E+02	3	2,33E+03	<b>0,2%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	6,21E+02	1	6,21E+02	<b>0,1%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	3,93E+02	3	1,18E+03	<b>0,1%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	1,73E+02	3	5,20E+02	<b>0,1%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	5,05E+01	1	5,05E+01	<b>0,0%</b>
						64	970200	<b>100,0%</b>

Tabla 13. Composición normalizada del aceite de palma

	Aceite de palma	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)
Composición	Normalizada	15,8	38,2	41,5	4,5

Tabla 14. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de palma

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	3,21E+03	1	3,21E+03	<b>0,3%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	8,90E+03	3	2,67E+04	<b>2,8%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	9,66E+03	3	2,90E+04	<b>3,0%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	1,06E+03	3	3,17E+03	<b>0,3%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	2,24E+04	3	6,73E+04	<b>6,9%</b>
6	<b>LOP</b>	1	2	3	2,50E+04	6	1,50E+05	<b>15,5%</b>
7	<b>LOS</b>	1	2	4	2,74E+03	6	1,64E+04	<b>1,7%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	2,65E+04	3	7,94E+04	<b>8,2%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	2,97E+03	6	1,78E+04	<b>1,8%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	2,53E+02	3	7,60E+02	<b>0,1%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	5,15E+04	1	5,15E+04	<b>5,3%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	5,90E+04	3	1,77E+05	<b>18,2%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	6,45E+03	3	1,94E+04	<b>2,0%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	6,42E+04	3	1,92E+05	<b>19,8%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	7,19E+03	6	4,32E+04	<b>4,4%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	6,14E+02	3	1,84E+03	<b>0,2%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	6,63E+04	1	6,63E+04	<b>6,8%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	7,62E+03	3	2,29E+04	<b>2,4%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	6,66E+02	3	2,00E+03	<b>0,2%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	4,08E+01	1	4,08E+01	<b>0,0%</b>
						64	970200	<b>100,0%</b>

Tabla 15. Composición normalizada del aceite de soja

	Aceite de soja	L (1)	O (2)	P (3)	S (4)	Ln (5)
Composición	Normalizada	53,5	24,1	11,3	4,1	7,0

Tabla 16. Cálculo de las probabilidades teóricas para el aceite de soja

		Posición			P <sub>i,j,k</sub> Individual	Nº casos	P <sub>i,j,k</sub> Grupal	Probabilidad
		1ª	2ª	3ª				
1	<b>LLL</b>	1	1	1	1,45E+05	1	1,45E+05	<b>15,0%</b>
2	<b>LLO</b>	1	1	2	6,77E+04	3	2,03E+05	<b>20,9%</b>
3	<b>LLP</b>	1	1	3	3,17E+04	3	9,50E+04	<b>9,8%</b>
4	<b>LLS</b>	1	1	4	1,15E+04	3	3,45E+04	<b>3,6%</b>
5	<b>LOO</b>	1	2	2	2,97E+04	3	8,91E+04	<b>9,2%</b>
6	<b>LOP</b>	1	2	3	1,45E+04	6	8,70E+04	<b>9,0%</b>
7	<b>LOS</b>	1	2	4	5,26E+03	6	3,16E+04	<b>3,3%</b>
8	<b>LPP</b>	1	3	3	6,18E+03	3	1,85E+04	<b>1,9%</b>
9	<b>LPS</b>	1	3	4	2,46E+03	6	1,48E+04	<b>1,5%</b>
10	<b>LSS</b>	1	4	4	6,74E+02	3	2,02E+03	<b>0,2%</b>
11	<b>OOO</b>	2	2	2	1,22E+04	1	1,22E+04	<b>1,3%</b>
12	<b>OOP</b>	2	2	3	6,25E+03	3	1,87E+04	<b>1,9%</b>
13	<b>OOS</b>	2	2	4	2,27E+03	3	6,80E+03	<b>0,7%</b>
14	<b>OPP</b>	2	3	3	2,78E+03	3	8,34E+03	<b>0,9%</b>
15	<b>OPS</b>	2	3	4	1,11E+03	6	6,64E+03	<b>0,7%</b>
16	<b>OSS</b>	2	4	4	3,03E+02	3	9,09E+02	<b>0,1%</b>
17	<b>PPP</b>	3	3	3	1,07E+03	1	1,07E+03	<b>0,1%</b>
18	<b>PPS</b>	3	3	4	4,72E+02	3	1,41E+03	<b>0,1%</b>
19	<b>PSS</b>	3	4	4	1,42E+02	3	4,25E+02	<b>0,0%</b>
20	<b>SSS</b>	4	4	4	2,62E+01	1	2,62E+01	<b>0,0%</b>
21	<b>LnLnLn</b>	5	5	5	2,17E+02	1	2,17E+02	<b>0,0%</b>
22	<b>LLnLn</b>	1	5	5	2,29E+03	3	6,88E+03	<b>0,7%</b>
23	<b>LLLn</b>	1	1	5	1,99E+04	3	5,96E+04	<b>6,1%</b>
24	<b>OLnLn</b>	2	5	5	1,03E+03	3	3,09E+03	<b>0,3%</b>
25	<b>LnLnP</b>	5	5	3	4,82E+02	3	1,45E+03	<b>0,1%</b>
26	<b>OLLn</b>	2	1	5	9,10E+03	6	5,46E+04	<b>5,6%</b>
27	<b>LnLP</b>	5	1	3	4,26E+03	6	2,55E+04	<b>2,6%</b>
28	<b>SLnLn</b>	4	5	5	1,75E+02	3	5,25E+02	<b>0,1%</b>
29	<b>OLnO</b>	2	5	2	3,92E+03	3	1,18E+04	<b>1,2%</b>
30	<b>OLnP</b>	2	5	3	1,91E+03	6	1,15E+04	<b>1,2%</b>
31	<b>PLnP</b>	3	5	3	8,16E+02	3	2,45E+03	<b>0,3%</b>
32	<b>SLnP</b>	4	5	3	3,25E+02	3	9,74E+02	<b>0,1%</b>
33	<b>LnOS</b>	5	2	4	6,94E+02	6	4,16E+03	<b>0,4%</b>
34	<b>LnLS</b>	5	1	4	1,54E+03	6	9,27E+03	<b>1,0%</b>
35	<b>LnSS</b>	5	4	4	8,90E+01	3	2,67E+02	<b>0,0%</b>
						122	969225,6421	<b>100,0%</b>