

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Caracterización química del aroma de matrices de interés



Realizado por: **Miguel López Sierra**

Dirigido por: **Ricardo López Gómez**



Universidad
Zaragoza

Departamento de Química Analítica

Caracterización química del aroma de matrices de interés

En el presente trabajo se realizó un estudio del perfil aromático de la flor de cannabis y la resina de hachís. El objetivo de este estudio fue hacer un cribado de las principales zonas de olor que componen el aroma de estas muestras e identificar los odorantes que las generan.

El extracto inicial se obtuvo mediante la aplicación de la extracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPE). Se analizaron los principales aromas presentes en estos extractos por cromatografía de gases acoplada a un sistema olfatométrico (GC-O) en dos fases estacionarias diferentes (DB-WAX y VF5-ms), obteniendo no solo una descripción de las mismos, sino también una medida de su importancia en el aroma global de la muestra. Aquellos compuestos que no se consiguieron identificar por estas técnicas se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de gases multidimensional (GC-O-FID-GC-O-MS).

Con la aplicación de este conjunto de técnicas se consiguió identificar de manera inequívoca múltiples odorantes muy influyentes en el aroma de estas muestras. Siendo la concentración del α -pineno y del mirceno superiores en la flor y la del linalool es superior en la resina. Por otra parte, el 3-metilbutirato y el canfeno solo están presentes en la flor, mientras que el eucaliptol solo está presente en la resina. Sin embargo, no se consiguió una identificación completa del odorante responsable del aroma más característico de estas muestras. Se obtuvo un extracto más concentrado de la flor de cannabis por extracción sólido-líquido. Este extracto se sometió a dos técnicas de separación (extracción selectiva de grupos tiol y fraccionamiento en columna preparativa) para tratar de aislar e identificar este compuesto por GC-MS y GC-O-FID-GC-O-MS, obteniéndose finalmente el espectro de masas del odorante responsable del aroma característico de estas muestras.

Chemical characterization of the flavour of relevant matrices

In this work the aromatic profile of cannabis flower and hashish resin were studied. The aim of the study is to perform a screening of the main odor zones that create the flavour of these samples and to identify the odorants that produce them.

The initials extracts were prepared applying a headspace-solid phase extraction (HS-SPE). The main flavours of these extracts were analyzed with gas chromatography coupled to an olfactometric system (GC-O) with two different stationary phases (DB-WAX and VF-5ms), getting not only the description of the flavor, but also a measure of their importance on the global flavour of the sample. Those compounds which could not be identified with these techniques were analyzed with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and multidimensional gas chromatography (GC-O-FID-GC-O-MS).

With the application of these technicques the identification of multiple odorants related to the flavour of these samples were achieved. On the one hand, α -pynene and myrcene were more concentrated in the flower and linalool was more concentrated in the resin. On the other hand, 3-metylbutirate and camphene were only found in the flower while eucalyptol was only found in the resin. However, it was not possible to achieve a complete identification of the odorant responsible of the characteristic flavour of these samples. Therefore, one aroma extract more concentrated from the flower was obtain using solid-liquid extraction. This extract was separated with two different technics (mercapto extraction and preparative chromatography) in order to isolated and identify the compound with GC-MS and GC-O-FID-GC-O-MS, finally producing the mass spectrum of the odorant responsible of the characteristic flavour of the samples.

Índice

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Introducción | 1 |
| 2. | Objetivos | 5 |
| 3. | Materiales y Métodos | 5 |
| 3.1. | Muestras..... | 5 |
| 3.2. | Reactivos y materiales..... | 6 |
| 3.3. | Obtención del extracto..... | 7 |
| 3.4. | Análisis por Cromatografía de Gases-Olfatometría (GC-O)..... | 8 |
| 3.4.1. | Panel olfatométrico | 8 |
| 3.4.2. | GC-O en columna DB-WAX..... | 9 |
| 3.4.3. | Estudio en otra fase estacionaria | 9 |
| 3.5. | Confirmación de los compuestos por análisis con GC-MS | 10 |
| 3.6. | Cromatografía multidimensional (GC-O-FID-GC-O-MS)..... | 10 |
| 3.7. | Extracción sólido-líquido y su fraccionamiento | 11 |
| 3.8. | Extracción selectiva de grupos mercapto..... | 13 |
| 3.9. | Tratamiento de datos | 14 |
| 3.9.1. | Cálculo del índice de retención | 14 |
| 3.9.2. | Cálculo de la frecuencia modificada..... | 14 |
| 4. | Resultados y Discusiones..... | 15 |
| 4.1. | Resultados GC-O y GC-MS | 15 |
| 4.2. | Resultados GC-O-FID-GC-O-MS | 19 |
| 4.3. | Resultados del análisis del extracto sólido-liquido fraccionado | 21 |
| 4.4. | Resultados de la extracción selectiva de grupos mercapto | 22 |
| 4.5. | Comparación con estudios anteriores y entre los dos tipos de muestra..... | 23 |
| 5. | Conclusiones..... | 24 |
| 6. | Bibliografía..... | 25 |

1. Introducción

El aroma de un producto está generado por moléculas volátiles denominadas odoríferas. Múltiples estudios han abordado el estudio de este tipo de moléculas en distintas muestras, como estudios en vinos realizados por San Juan¹ y Saenz-Navajas², moras realizados por Zhu³ o tequila, realizados por Benn⁴. Para la realización de un correcto estudio del conjunto de moléculas volátiles odoríferas presentes en una muestra y su caracterización hay que plantear un trabajo de investigación dividido en una serie de etapas. En primer lugar, se requiere la obtención un extracto representativo del conjunto de componentes volátiles de la muestra. Posteriormente, es necesario realizar un cribado sensorial de los componentes volátiles que aportan el aroma a la muestra. Y, para terminar, se debe realizar la identificación de las moléculas responsables de ese aroma. Una vez realizados estos pasos es interesante intentar plantear una reconstrucción del olor de la muestra a partir de la combinación de las distintas moléculas odoríferas identificadas. Una cuantificación completa de todos los componentes volátiles presentes, y una posterior adición sobre los anteriores, nos permite hacer una reconstrucción muy similar a la muestra original.

La obtención de un extracto representativo del producto es el primer paso y uno de los más importantes para realizar un estudio del conjunto de componentes volátiles presentes. Hay muchos métodos de extracción disponibles, ya sea con extracción líquido-líquido (empleando disolventes por los que los analitos muestran cierta afinidad, por lo que se separan del resto de la muestra líquida), empleada por ejemplo en la caracterización de los odorantes en el tequila realizada por Benn⁴, con extracción de odorantes asistida por disolvente (SAFE) (la cual está basada en una destilación con arrastre de vapor, separando cuidadosamente los volátiles) empleada por Engel⁵ o extracción de espacio de cabeza (que aprovecha la volatilidad de estos analitos para extraerlos mediante el empleo de una corriente de N₂ que arrastra los analitos de la muestra, guiándola a través de un cartucho de fase sólida en el que los analitos quedan retenidos y con la posterior elución de este cartucho con un disolvente afín por los analitos). Este último método, también conocido como extracción en fase sólida en espacio de cabeza dinámico (HS-SPE), es un método bastante empleado para este tipo de estudios, como los de San Juan¹ y Saenz-Navajas².

Una vez obtenido el extracto hay que plantear una técnica que nos permita no solo separar los diferentes analitos, sino también el estudio de su olor (descriptor e intensidad). La cromatografía de gases con olfatometría (GC-O) es una gran herramienta empleada en el estudio de los componentes responsables del aroma en diversas matrices (vinos, plantas...)^{1,2}. La cromatografía de gases es un método de separación por el cual se separan los componentes de una mezcla al ser arrastrados por un gas inerte (fase móvil) en función de las distintas velocidades a las que viajan a través de una columna de fase estacionaria. Esta velocidad depende de tendencia del componente a interaccionar con la fase estacionaria (disolviéndose o adsorbiéndose) o de comportarse como un gas y eluir a una velocidad más parecida a la de la fase móvil. Por lo general, cuanto más grande y polar es la molécula a menor velocidad

eluirá por la fase estacionaria. Un aumento en la temperatura de la columna produce que las moléculas tiendan a comportarse más como un gas y por tanto viajaren a mayor velocidad por la fase estacionaria. Esta técnica consigue que los distintos odorantes lleguen separados y completamente volatilizados al detector, por lo que se pueden detectados individualmente. Lo característico de la técnica GC-O es que una vez la muestra ha eluido a través de la columna y ha llegado al detector, una parte es redireccionada a un inhalador o puerto de olfatométrico (nariz) en el que se encuentra un voluntario el cual va anotando los olores que va captando (descriptores), el tiempo que ha pasado desde que se produjo la inyección de la muestra hasta que percibió el olor (tiempo de retención) y la intensidad con la que lo ha detectado. Para poder realizar la identificación de estos compuestos es necesario calcular el índice de retención (IR), que se calcula mediante la relación entre el tiempo de retención de los analitos y el tiempo de retención de una serie de alkanos lineales. Este procedimiento se realiza con varios voluntarios, ya que el olor es subjetivo, lo que nos permite obtener una aproximación de los principales compuestos volátiles que producen olor en un determinado extracto.

Una vez que se ha realizado el estudio antes planteado y ya se tiene información básica (IR, descriptor, intensidad) de los principales odorantes se procede a realizar la identificación. Esto se puede realizar mediante la búsqueda en diferentes fuentes bibliográficas de la identidad de los compuestos que encajen con la información obtenida del estudio anterior. También se puede plantear realizar la cromatografía en la misma fase estacionaria y emplear como detector un espectrómetro de masas, lo que nos dará un espectro de masas con las diferentes especies cargadas generadas en la rotura del analito. Estos espectros se pueden comparar con bibliotecas de espectros, como “NIST”, para obtener una posible identificación.

Uno de los principales problemas de los procedimientos anteriormente mencionados es la posibilidad de que varios compuestos coeluyan, lo que dificultaría la identificación. Para solucionar este problema podemos plantear un análisis cromatográfico multidimensional (GC-O-FID-GC-O-MS). Este tipo de análisis se realiza en un equipo dual, el cual consta de dos columnas cromatografías con diferentes fases estacionarias y conectadas en línea. El método cromatógrafo multidimensional consiste en realizar una primera cromatografía de gases con olfatometría en la primera columna del equipo dual. En una posterior etapa se considera el tiempo de retención del principal odorante que no conseguimos identificar y se programa un método específico en el cual se lleva a cabo una criofocalización con CO₂ de ese pico y se transporta a una segunda columna cromatográfica, con fase estacionaria diferente, para una segunda separación. Tras esta segunda etapa se produce la detección por olfatometría en la segunda columna y la adquisición del espectro de masas, lo que nos permite distinguir ese compuesto en el cromatograma según su olor y determinar su pico cromatográfico en el espectro de masas, obteniendo una identificación final. Esta técnica fue empleada por Marchini⁶ en su estudio.

Una de las ventajas de la olfatometría es su sensibilidad, ya que nuestro olfato es capaz de detectar algunos odorantes a una escala de ng/L. Estos compuestos al estar en una concentración tan pequeña puede que no generen un pico apreciable en el espectrómetro de

masas, lo que nos dificulta la identificación. Para solucionar esto hay que plantear métodos para obtener el analito en una mayor concentración. Una de las técnicas más básicas es la concentración, en la cual aprovechamos la volatilidad del disolvente en el que tenemos el extracto para desplazarlo con una corriente de N₂, lo que aumenta la concentración de los analitos. Este proceso no es el más eficiente, ya que también se produce la perdida de los analitos por evaporación, pero es uno de los más cómodos y prácticos. Otra posibilidad es plantear una extracción más agresiva para obtener una mayor cantidad de analito, lo que generara un extracto más sucio y concentrado, esto es un problema, ya que un extracto sucio puede contaminar los dispositivos cromatográficos en los que se inyecte. La limpieza de este extracto se puede realizar por fraccionamiento en una columna (Cromatografía sólido-líquido), en la cual se produce la separación de los componentes de una muestra en función de su afinidad por una fase estacionaria sólida (en la que quedan retenidos o adsorbidos) o por la fase móvil líquida (con la cual se comportan como un líquido miscible eluyendo a través de la columna). Hay un amplio rango de variantes de esta técnica en función de las fases estacionaria y móvil empleadas, siendo la cromatografía en fase reversa (en la cual se emplea una fase estacionaria apolar) la más empleada. Con la aplicación de este tipo de técnicas no solo se eliminan las sustancias poco volátiles que pueden ensuciar los equipos, sino que también se separan los diferentes analitos en distintas fracciones en función de su velocidad de elución por la columna. Tras realizar un estudio de estas fracciones y seleccionar las que contienen el odorante deseado se concentran para obtener un extracto final con una concentración más elevada del analito deseado.

Una vez identificados los posibles odorantes se puede plantear una reconstrucción del aroma de la muestra mediante una mezcla de los mismos, lo que nos permite confirmar los resultados. Esto se puede hacer con concentraciones variables de los distintos componentes o intentando cuantificar para una aproximación más exacta a la concentración en la muestra.

Este trabajo va enfocado a la práctica y aprendizaje de las técnicas antes mencionadas, las cuales son empleadas en el screening y determinación de compuestos volátiles odorantes. Para el desarrollo de este tipo de técnicas se planteó como finalidad el estudio de los odorantes presentes en la flor de marihuana y resina de hachís, las cuales son muestras sólidas y bastante diferentes al tipo de matrices con las que se suelen realizar este tipo de técnicas, por lo que fue necesario el planteamiento y la realización de una adaptación de las mismas. El cannabis es un tipo de planta cuyas flores han sido empleados como medicina y droga de abuso desde tiempos inmemoriales. El cannabis es principalmente empleado en farmacología por sus cannabinoides, una clase de terpeno que solo se encuentran en el cannabis. Estos terpenos se encuentran principalmente en la resina de la flor producida por la variedad hembra de la planta, donde también se encuentra el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) el cual es psicoactivo. Esta resina también contiene una gran variedad de monoterpenos y sesquiterpenos. Algunos de estos terpenos interaccionan con diversos receptores en el organismo generando efectos ansiolíticos, antiinflamatorios y sedantes. Se sospecha que esta clase de terpenos son lo que le da el sabor al cannabis, algunos de estos terpenos son muy parecidos al Humulus lupulus, el cual es un componente muy importante durante la

preparación de la cerveza, contribuyendo a darle sabor. Sin embargo, se desconoce si también pueden ser los responsables del olor tan característico que tiene el cannabis. Por lo general, el olor está generado por componentes volátiles los cuales se encuentran en muy baja concentración. Esta baja concentración es la razón por la que, a pesar del empleo de perros para la detección olfativa de drogas, no se ha intentado desarrollar métodos forenses basados en este tipo de compuestos. En su lugar, estos están basados en compuestos activos que se encuentran en altas concentraciones, por lo que no ha sido estrictamente necesario un estudio de las moléculas odoríferas del cannabis. Sí que ha habido diversos estudios de los principales componentes volátiles presentes en este tipo de planta, como los estudios realizados por Marchini⁶, Wiebelhaus⁷, Booth⁸ y Rice⁹, pero hasta la fecha, no se ha llevado a cabo una identificación clara de los principales odorantes.

El hachís es un derivado del cannabis obtenida a partir de la compresión de la resina de las flores de la variedad de cannabis hembra, donde se encuentra principalmente el THC. Para ello se recogen los cogollos, se dejan secar, se Trituran y se filtra la resina resultante. En algunos países este proceso se hace de manera mucho menos técnica empleando la compresión y deformación de la flor de la marihuana a mano hasta la obtención de la resina comprimida. Por lo tanto, el hachís obtenido por estos procesos tiene una composición parecida a la flor de cannabis original. Por lo general también se le añaden diversos aditivos para aumentar su peso o conferirle otras propiedades. Diversas fuentes sugieren que tanto la flor de cannabis como el hachís tienen un olor similar y que para poder diferenciarlos solo por el olor hay que estar bastante familiarizado con este tipo de sustancias.

Los estudios anteriores^{6,7,8,9} revelan una gran variedad de terpenos, siendo los siguientes los que más pueden contribuir al olor:

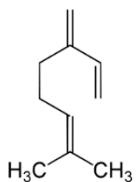


Fig. 1. Mirceno

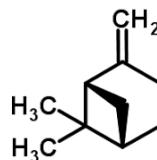


Fig. 2. (+)-beta-pineno

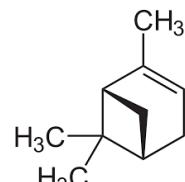


Fig. 3. (+)-alpha-pineno

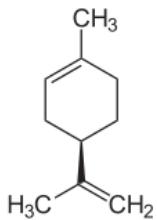


Fig. 4. (-)-limoneno

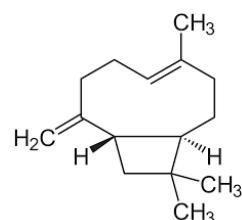


Fig. 5. beta-cariofileno

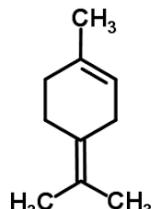


Fig. 6. terpinoleno

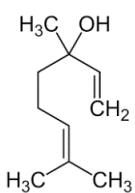


Fig. 7. linalool

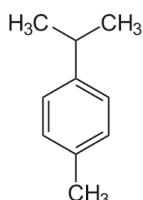


Fig. 8. p-cimeno

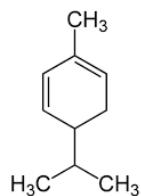


Fig. 9. alfa-felandreno

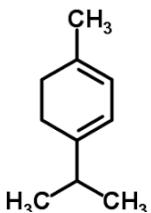


Fig. 10. alfa-terpineno

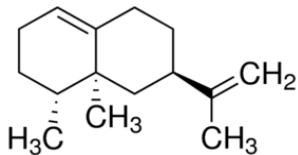


Fig. 11. valenceno

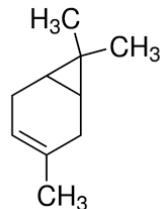


Fig. 12. delta-3-careno

2. Objetivos

Este trabajo va enfocado al screening e identificación de los principales odorantes presentes en la flor de marihuana y la resina de hachís mediante el empleo de distintas técnicas basadas en la cromatografía de gases y la olfatometría. El carácter novedoso de este objetivo y su clara dificultad por la posibilidad de presentar múltiples problemas muy comunes en cualquier estudio de investigación hizo que este enfoque fuera curioso e interesante para plantear un TFG. Además, este tipo de resultados pueden ser comercializados y empleados tanto para el desarrollo de nuevos perfumes como para el empleo de esta información por los cuerpos y fuerzas de seguridad del estado para el entrenamiento de perros policía u otras finalidades.

También cabe recalcar que tanto la obtención de este tipo de muestras como la aprobación de este proyecto se llevaron a cabo de forma legal y con las pertinentes autorizaciones burocráticas y judiciales, las cuales se explicaran de forma más detallada en el apartado de materiales y métodos, obtención de la muestra.

3. Materiales y Métodos

3.1. Muestras

Para la obtención de las flores de cannabis y la resina de hachís, debido al carácter ilegal de este tipo de sustancias, se necesitaron una serie de órdenes y permisos judiciales y burocráticos cuya resolución queda recogida en el Anexo 1. Tras llevar acabo estos trámites se procedió a recoger estas sustancias al punto acordado por las instituciones públicas. Las muestras de cannabis y hachís fueron facilitadas por el laboratorio del cuerpo de Policía Nacional. Estas muestras procedían de una incautación y no recibieron ningún tratamiento

químico por parte de la policía científica, por lo que eran muestras perfectamente representativas del tipo de estupefacientes que circulan por las calles.

3.2. Reactivos y materiales

Para el tratamiento y análisis de estas muestras se emplearon los siguientes reactivos y materiales:

- Resina LiChrolut EN la cual es un copolímero de estireno y vinilbenceno de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania).
- Cartuchos de polipropileno estándar para SPE con 0,8 cm de diámetro interno y 3 mL de volumen interno suministrados por la casa comercial Superco (Bellefonte, PA).
- Frits de polietileno de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania).
- Diclorometano y metanol de calidad GC con una pureza de ≥99,8% en peso de la casa comercial Fiser Science UK.
- Sistema de extracción para HS-SPE, también llamado “boca de extracción”. Fue diseñada en el laboratorio.
- N₂ gas de pureza >99,9% en volumen de la marca comercial Air Liquide.
- Disolución estándar interno (butirato de hexilo) 30 mg/L en diclorometano.
- Disolución de alcanos lineales C7 a C30 de 5 mg/L en diclorometano preparada en el laboratorio.
- Agua MilliQ de la casa comercial Millipore.
- Columna de rectificación y baño termostatizado.
- Pentano 99,9% en peso de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania).
- Éter dietílico Fiser Science UK.
- L-Cisteína >97% en peso de la casa comercial SAFC (Alemania).
- Sal de Mercurio (ácido para-hidroximercuri benzoico) ≥95% en peso de la casa comercial Fluka Chimika (Alemania).
- Filtros de HPLC con un tamaño de poro de 0,5 µm de tipo FH de la casa comercial Millipore.
- Piedra pómex de la casa comercial Panreac Quimica (Barcelona, España).
- Disoluciones de NaOH 8M y HCl 18% en peso preparadas en el laboratorio.
- Sulfato de sodio de la casa comercial Panreac Quimica (Barcelona, España).
- Concentrador tipo Kuderna-Danish.
- Sílica gel 60 (tamaño de partícula 40-63 µm) de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania).
- Columna sin fase (25 mm de diámetro interno y 450 mm de longitud) de la casa comercial Omnifit.
- Cis-sabidieno hidrato 1% en etanol Sigma-Aldrich (Alemania)

3.3. Obtención del extracto

Para la obtención del extracto de partida se planteó la aplicación de una extracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPE) a las dos muestras por separado: la flor de cannabis y la resina de hachís, basándose en el método empleado por San-Juan¹ con algunas modificaciones para adaptarlo a este estudio. Esta extracción se realizó por separado a las dos muestras en una “boca de extracción” (Fig. 13) (este es el nombre del dispositivo de extracción).

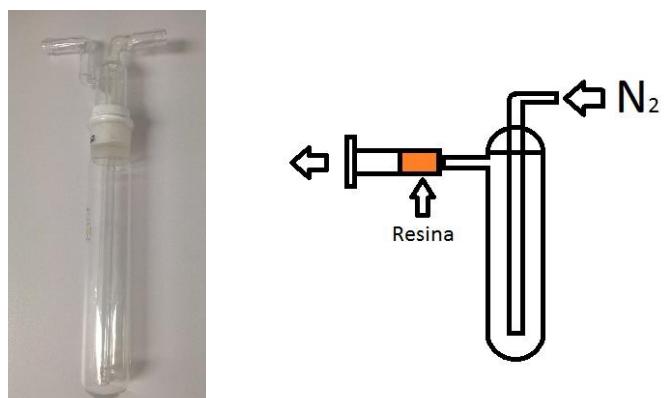


Fig. 13. boca de extracción y
esquema de HS-SPE

Para preparar este dispositivo primero se preparó un cartucho de extracción en fase sólida (SPE): se pesaron aproximadamente 400 mg de resina LiChrolut EN (399,5 mg para la extracción de la flor y 400,2 mg para la resina), esta resina se dispuso en un cartucho de SPE de manera que esta estuviera inmovilizada entre dos frits. Esta resina se purificó con 20 mL de diclorometano y se secó a vacío. Una vez preparado el cartucho se dispuso la muestra en el interior de la boca siguiendo en ambas el mismo procedimiento: se introdujo aproximadamente 1 g de muestra (se empleó 1,0736 g para la flor y 1,0526 g para la resina) en el dispositivo de manera que estuviera bien distribuida por las paredes de la boca (Fig. 14), se introdujo el cartucho se SPE en la salida de la boca con un adaptador y se conectó la entrada del dispositivo a una bombona de N₂, la cual generaba un flujo controlado de 500mL/min a través de la boca durante 1 hora y 40 minutos, esto producía que los volátiles presentes en el espacio de cabeza fueran arrastrados por el N₂ y retenidos en el cartucho. Al terminar se retiró el cartucho y se secó durante no más de 10 minutos con un flujo suave de N₂. Posteriormente, se eluyeron los analitos retenidos en este con 3,2 mL de una disolución 95%diclorometano / 5%metanol, se adicionaron 40 µL de estándar interno al eluato y se llevó a un concentrador Kuderna-Danish, donde se concentró con una corriente suave de N₂ hasta un volumen final de 200 µL. Finalmente se conservó en un congelador a -20 °C hasta su utilización, lo que desfavorecía la perdida de sustancias volátiles.



Fig. 14. Disposición de la muestra en la

3.4. Análisis por Cromatografía de Gases-Olfatometría (GC-O)

La GC-O requiere de un panel olfatómetro y la posibilidad de realizar el estudio en distintos tipos de fase estacionaria para obtener más información la cual nos permita poder llegar a la identificación de algunos odorantes.

3.4.1. Panel olfatométrico

Como el aroma es subjetivo y su descripción varía en función de receptor, para poder hacer un estudio aromático es necesario recurrir a un panel olfatométrico, es decir, un conjunto de personas entrenadas específicamente para realizar la evaluación de los aromas que eluyen de una columna cromatográfica. El panel empleado estuvo compuesto de 6 personas (3 hombres y 3 mujeres) todos ellos miembros del grupo de investigación y bien entrenados en el análisis olfatométrico. El panel se organizó por parejas: una persona realiza la detección sensorial en el inhalador de la primera mitad del cromatograma y su pareja le releva a la mitad de este, en la siguiente olfatometría se invierte el orden, de manera que los panelistas huelean todo el cromatograma sin estar más de 20 minutos en el inhalador, lo que podría disminuir su atención a causa de la fatiga. A lo largo de la olfatometría el panelista debe tomar nota del tiempo, descriptor e intensidad de cada uno de los aromas que vaya detectando. La intensidad se indicó con una escala de valores desde 0 hasta 3 (0 = olor no detectado, 1 = olor débil, 2 = olor claro, 3 = olor intenso) pudiendo emplear números enteros y semienteros.



Fig. 15. Panelista realizando una olfatometría

3.4.2. GC-O en columna DB-WAX

Para el estudio del perfil aromático de los extractos se realizaron inyecciones de 1 μL en un equipo de GC-O Varian de la serie Thermo 8000 equipado con un detector de ionización a llama (FID) y un puerto olfatométrico o inhalador (ODO-I de SGE) ambos conectados por un divisor de flujo a la salida de la columna. El inhalador estaba equipado con un humidificador de agua desionizada para evitar la sequedad de nariz durante la olfatometría. La columna empleada fue una DB-WAX (Agilent tecnologies) 30 m x 0,32 mm con un espesor de fase de 0,5 μm , la cual es una fase estacionaria polar, precedida por una precolumna de sílice Supelco, 3 m x 0,32 mm. Las condiciones instrumentales fueron: H_2 como gas portador a un caudal de 3 mL/min; inyección en splitless (tiempo de splitless 60 segundos); temperatura en el inyector y detector de 250 $^{\circ}\text{C}$ y la siguiente rampa de temperaturas en el horno: inicialmente se mantuvo a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos seguido de una rampa de 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 100 $^{\circ}\text{C}$ y una rampa final de 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 220 $^{\circ}\text{C}$ manteniendo esta temperatura durante 10 minutos. El control del equipo y la adquisición de los datos por parte del detector se realizó mediante el software Chorm card data system 2.3 de Thermoelectron (Milán, Italia).

3.4.3. Estudio en otra fase estacionaria

Para complementar los datos obtenidos en la columna polar (DB-WAX) se realizó un estudio en un cromatógrafo Fisons, el cual estaba equipado con un detector FID y un puesto olfatométrico. Se empleó una columna con una fase estacionaria apolar: VF-5ms (Varian) de 30 m x 0,32mm con un espesor de fase de 1 μm .

Para este análisis se emplearon las siguientes condiciones: hidrógeno como gas portador con un flujo de 3,5 mL/min; inyección en Split con un ratio 1/10; volumen de inyección de 1 μL ; temperatura en el inyector y detector de 250 $^{\circ}\text{C}$ y se programó la siguiente rampa de temperatura en el horno: inicialmente se mantuvo una temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$ durante los 3 primeros minutos, seguida de una rampa de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los 100 $^{\circ}\text{C}$ y al alcanzar

esta temperatura comenzó una rampa final de 8 °C/min hasta 250 °C, manteniéndose esta temperatura durante 10 minutos. Tanto el control de esta serie de parámetros como la adquisición de los datos se llevó a cabo mediante el empleo del Software Chrom Card para Windows versión 1.21.

3.5. Confirmación de los compuestos por análisis con GC-MS

Para facilitar la identificación de los distintos odorantes encontrados en el estudio olfatométrico de los extractos se realizó un análisis en un cromatógrafo de gases GC-450 de Varian (Walnut Creek, CA, USA) con un espectrómetro de masas de captura de iones Varian Saturn 2200 como detector (GC-MS). El equipo estaba equipado con una columna DB-WAX (Agilent technologies) de 60m x 0,25 mm y de espesor de fase de 0,25 µm.

Las condiciones elegidas para este análisis fueron: helio como gas portador a un flujo de 1,5 mL/min; inyección en splitless (con un tiempo de splitless de 180 segundos); volumen de inyección 1 µL; injector 1790 PTV a 300 °C y el siguiente programa de temperaturas en el horno: inicialmente se mantuvo a 35 °C durante 3 min, posteriormente la temperatura aumentaba a 2 °C/min hasta 220 °C seguida de una subida de 20 °C/min hasta 240 °C, manteniéndose a esta temperatura durante 30 minutos. La adquisición de iones comenzó a los 7 minutos de inyectar (para no saturar el detector con disolvente) y se realizó durante el resto del cromatograma con un rango de 45-320 m/z y a 170 °C.

3.6. Cromatografía multidimensional (GC-O-FID-GC-O-MS)

Algunos de los odorantes responsables de las principales zonas de olor (intervalos en los que se capta un aroma en olfatometría) no se consiguieron identificar por medio de las técnicas anteriormente descritas. Por ello se decidió aplicar un análisis multidimensional al extracto generado a partir de la flor de cannabis, ya que las zonas de olor objetivo coincidían en IR y descriptor en los dos tipos de extractos (flor de cannabis y resina de hachís), por lo que se dedujo que eran producidas por la presencia del mismo odorante en los dos extractos. Por este motivo solo hizo falta someter al extracto obtenido a partir de la flor de cannabis al análisis multidimensional (GC-GC-MS) para intentar identificarlos. Esta técnica se aplicó empleando un equipo dual de Varian (Walnut Creek, CA) compuesto por dos cromatógrafos CP-3800 independientes. El primero de los cromatógrafos estaba equipado con una columna de DB-WAX (Agilent technologies) de 30m x 0,32 mm con un espesor de fase estacionaria de 0,5 µm, un puerto olfatométrico y un detector FID. El segundo de los cromatógrafos estaba equipado con una columna VF-5ms (Varian) de 30 m x 0,32mm con un espesor de fase de 1 µm, un puerto olfatométrico y un espectrómetro de masas Varian 240-MS como detector. Estos cromatógrafos estaban conectados por una línea de transferencia a 200 °C.

Las condiciones para la realización de este estudio fueron las siguientes: se inyectaron 10 µL de extracto, para una primera detección olfativa en la primera columna (o dimensión); inyección splitless (con un tiempo de splitless de 156 segundos) a una temperatura de 250 °C

en el inyector; helio a 30 psi como gas portador y el siguiente programa de temperaturas en el horno de la primera dimensión: inicialmente se mantuvo a 40 °C durante 5 minutos, posteriormente se realizó una rampa de 4 °C/min hasta 100 °C seguida una última rampa de 6 °C/min hasta 220 °C y se mantuvo esta temperatura durante 15 minutos. Una vez detectadas las zonas de olor objetivo en la primera columna. Se repite la inyección realizando una criofocalización con CO₂ del flujo de salida de la primera columna en la zona del olor de interés, este flujo de CO₂ se inició dos minutos antes y terminó dos minutos después de la zona de olor deseada para garantizar una correcta transferencia del analito de un cromatógrafo al otro. Esta fracción criofocalizada eluyó posteriormente por la segunda columna empleando en el horno el siguiente programa de temperaturas: comenzó a una temperatura de 50 °C manteniéndose 7,45 minutos (en unidades centesimales), se realizó una rampa de temperaturas de 4 °C/min hasta 200 °C y por último se aplicó una rampa de 50 °C/min hasta 300 °C, manteniéndose dicha temperatura durante 10 minutos. Una vez identificados los compuestos en la olfatometría de la segunda columna se estudió los espectros de masas generados en un rango de m/z 35-220 adquiridos en el tiempo de detección del aroma deseado.

3.7. Extracción sólido-líquido y su fraccionamiento

A pesar de emplear las técnicas ya mencionadas, no se logró obtener un espectro de masas de determinados aromas. Esto pudo ser debido a que la baja concentración con la que esos odorantes generaban el aroma. Para obtener un extracto más concentrado se planteó una extracción sólido-líquido poniendo en contacto 5 g de flor de cannabis con 200 mL de 90% pentano/ 10% dietil eter y agitación suave, evitando la rotura de las flores. Este procedimiento generó un lixiviado verdoso (Fig. 16), el cual se filtró con filtros de HPLC de la compañía Millipore de tamaño de poro de 0,5 µm, ya que eran resistentes al pentano y al éter. Tras comprobar que el filtrado retenía el aroma deseado se realizó una segunda extracción en las mismas condiciones para mejorar el rendimiento, con lo que obtuvimos un extracto final de aproximadamente 400 mL.



Fig. 16. lixiviación

Una vez filtrado el extracto se realizó una concentración hasta 100 mL mediante destilación vertical (Fig. 17). El dispositivo empleado estaba formado por un kuderna, un acople para aumentar el volumen del dispositivo, una columna de rectificación, un baño termostatizado a 38 °C y una piedra pómex para homogeneizar el residuo de la rectificación con las burbujas emitidas por esta. El dispositivo cargado con el extracto se introduce en el baño, lo que produce una rectificación en los platos de la columna, en los cuales los vapores que suben están a contracorriente con el líquido que ha condensado y baja de estos, lo que genera un enriquecimiento de los compuestos más volátiles en el vapor y respectivamente un enriquecimiento de los compuestos menos volátiles en el líquido.

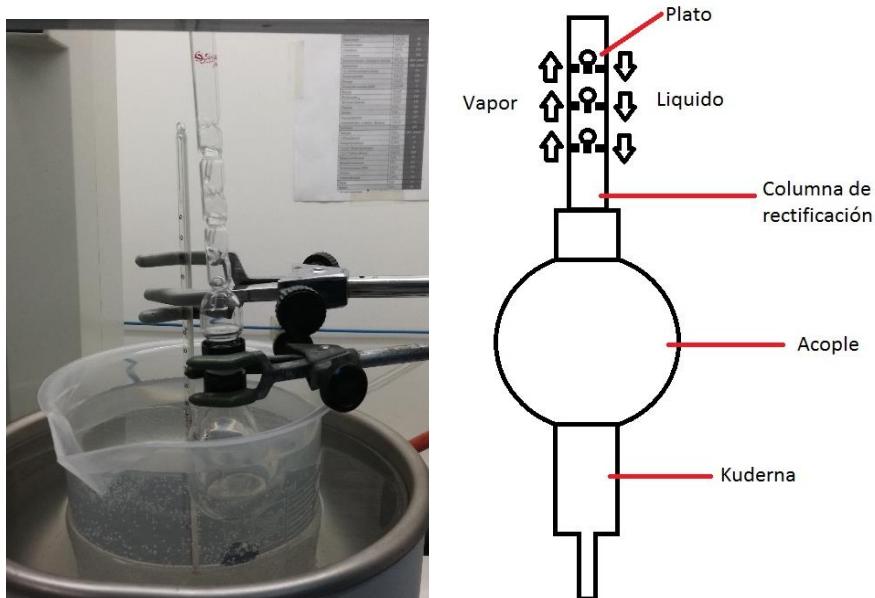


Fig. 17. Esquema de rectificación y montaje

Como resultado obtuvimos una disolución muy concentrada, pero también muy sucia y coloreada (las sustancias coloreadas no suelen ser volátiles y pueden estropear los equipos de GC en los que se inyecten). Por lo tanto, se realizó un fraccionamiento de 50 mL del extracto en una columna de sílica (Fig. 18) de 25 mm de diámetro interno y 450 mm de longitud y un tamaño de partícula 40-63 µm en pentano preparada en el laboratorio (empaquetando sílica gel 60 en una columna Omnitfit). Se eluyó con una mezcla pentano/dietil éter a un flujo de 5 mL/min, aumentando gradualmente el porcentaje de éter en la fase móvil tras cada paso de un volumen muerto (el cual es el volumen de la columna=140 mL) de la siguiente manera A = pentano, B= dietil éter (con A%/B%): (100/0); (99/1); (98/2); (95/5); (90/10); (80/20); (50/50); (0/100).



Fig. 18. cromatografía sólido-liquido

El eluato se recogió a la salida en fracciones de aproximadamente 60 mL, obteniéndose un total de 20 fracciones. Posteriormente se llevó a cabo un estudio aromático (realizado por un panel de 3 personas) de estas fracciones colocando unas gotas de la fracción a estudiar en una tira de olfacción, tras la evaporación del disolvente se procedió a oler la tira y describir su aroma.

Finalmente, se concentraron las fracciones de interés por destilación vertical en una columna de rectificación (mediante el procedimiento previamente explicado) y se inyectaron en el equipo de GC-MS y GC-GC-MS siguiendo el mismo procedimiento que en los puntos 3.5 y 3.6 de este trabajo, con una modificación del volumen de inyección en el GC-O-FID-GC-O-MS a 2 μ L.

3.8. Extracción selectiva de grupos mercapto

Finalmente, para completar este estudio se planteó realizar una extracción selectiva de compuestos con grupos mercapto (tiol), ya que esta clase de compuestos suelen generar aroma a muy bajas concentraciones, por lo que sospechamos que alguno puede ser responsable de alguna zona del olor que no se consiguió identificar por las técnicas anteriores. Para ello se aplicó el método empleado por Tominaga¹⁰ realizando algunas modificaciones para adecuarlo a nuestro estudio. Se realizó tres extracciones líquido-líquido a 50 mL del extracto obtenido en el punto 3.6 (lixiviación) con 10 mL una fase acuosa 1 mM en para-hidroximercuribenzoato (la cual es una sal de mercurio que forma complejos muy fuertes con grupos mercapto) y 0,01 M en NaOH dejando la mezcla 10 minutos con agitación y dejando separar las fases antes de cada decantación. Una vez separadas las dos fases se combinaron las fases acuosas y se les adicionó 5 mL de una disolución que contenía 400 mg de cisteína (aminoácido empleado para romper los complejos Hg-tiol por desplazamiento) a pH 7 ajustado con NaOH. Se ajustó el pH resultante a 7 con una disolución de HCl y se dejó reposar 10 minutos hasta alcanzar el equilibrio. Finalmente se realizaron 3 extracciones con 3 mL de diclorometano, produciendo que el complejo Hg-cisteína se retuviera en la fase acuosa y nuestros analitos pasaran a estar disueltos en la fase orgánica (diclorometano). Tras juntar las

fases orgánicas resultantes se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron con una corriente de N₂ en un kuderna hasta 200 µL y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Este extracto se estudió por GC-O en columna apolar y GC-MS siguiendo los mismos procedimientos descritos en los puntos 3.4 y 3.5 de este trabajo.

3.9. Tratamiento de datos

3.9.1. Cálculo del índice de retención

Para poder relacionar los distintos aromas identificados por los panelistas y intentar realizar una identificación de los odorantes que los producen es necesario el cálculo los índices de retención de las diferentes zonas de olor encontradas. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$IR = 100 \times z + 100 \times \frac{\log t'r(x) - \log t'r(z)}{\log t'r(z+1) - \log t'r(z)}$$

Siendo:

- **z** el número de carbonos del último alcano anterior al aroma en el cromatograma.
- **t'r (x)** el tiempo centesimal (tiempox100/60) al que se detecta el aroma.
- **t'r (z)** el tiempo centesimal al que se detecta el último alcano anterior al aroma.
- **t'r (z+1)** el tiempo centesimal al que se detecta el primer alcano posterior al aroma.

Para obtener los tiempos de retención de los alcanos se inyectó una disolución de alcanos lineales desde C8 hasta C30 en los mismos cromatógrafos y empleando las mismas condiciones que en los análisis anteriormente mencionados.

3.9.2. Cálculo de la frecuencia modificada

Para determinar que aromas son captados por la mayoría de los panelistas con una intensidad adecuada (y por tanto son relevantes para generar el olor global de la muestra) es necesario calcular la frecuencia modificada (FM). Para ello, se agrupan los distintos aromas captados por distintos panelistas según su IR y descriptor similar. A continuación, se calcula la FM aplicando la fórmula propuesta por Dravnieks¹¹. Esta fórmula tiene en cuenta para el cálculo de la FM tanto el número de panelistas que captan dicho aroma como la intensidad con la que lo describen:

$$\%FM = \sqrt{\%Fr \times \%Int}$$

Siendo:

- %Fr = Nº de panelistas que detectan el aroma / Nº de jueces en el panel x 100
- %Int = Suma de las intensidades / Suma máxima posibilidad de intensidades (máxima intensidad x número de panelistas) x 100

Por lo general en este tipo de estudios se considera que para que un aroma tenga una importancia significativa en un determinado extracto debe tener una %FM ≥ 30, los aromas que no alcancen dicho valor no se consideran relevantes en el perfil aromático de un extracto. Esto se debe a que a pesar de que un panelista capte una determinada ventana de olor con una determinada intensidad esto no significa que ese aroma sea necesariamente relevante.

4. Resultados y Discusiones

4.1. Resultados GC-O y GC-MS

Inicialmente se planteó obtener el extracto mediante HS-SPE (punto 4.3), ya que es una de las técnicas más sencillas y rápidas de extraer selectivamente los compuestos volátiles presentes en una muestra. Sin embargo, también posee una serie de desventajas, las cuales si no se solucionan se precisaría el empleo de otras técnicas: su baja eficiencia (lo que puede generar extractos con una concentración muy baja de determinados compuestos odorantes, lo que puede dificultar su detección e identificación) y su necesidad de un planteamiento adecuado de la disposición de la muestra en la boca de extracción (de lo contrario se pueden generar caminos preferenciales o extracciones superficiales, generando extractos poco representativos).

Los resultados obtenidos tras analizar por GC-O y GC-MS los extractos generados por HS-SPE a partir de flor de cannabis y resina de hachís y el tratamiento de dichos datos se encuentran recogidos en la Tabla 1. Dicha tabla contiene los IR en las dos columnas empleadas (DB-WAX y VF-5ms), los descriptores empleados por los panelistas para definir el aroma presente en cada zona de olor, la identificación del compuesto odorante (en el caso de que haya sido posible) indicando el número de evidencias en las que nos basamos para proponer esta identificación y las frecuencias modificadas en cada tipo de muestra (en esta tabla solo se han recogido aquellas zonas del olor con una FM > 30%, ya que pueden considerarse como odorantes poco influyentes en el olor global).

Tabla 1. Resultados GC-O y GC-MS 1

| IR DB- wax | IR VF- 5ms | Descriptores | FM flor cannabis | FM resina hachís | Identificación |
|------------------|------------------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| 1020 | 935 | resina, pino | 53 | 31 | α-pineno [2] |
| 1061 | | fresa, dulce, licoroso | 53 | | canfeno [1] |
| 1076 | 850 | dulce, aspirina, anís | 61 | | 3-metilbutirato de etilo [2] |
| 1172 | 986 | Geranio | 93 | 35 | n.i.1172 |
| 1191 | | madera, paja | | 36 | n.i.1191 |
| 1212 | | herbal, menta | | 41 | eucaliptol [1] |

| | | | | | |
|------|------|--|----|----|--------------|
| 1363 | | madera, herbal, floral, dulce | | 30 | n.i.1363 |
| 1443 | 1070 | característico cannabis | 78 | 85 | n.i.1443 |
| 1516 | | papel, herbal, verde, plástico, grasa | 43 | 65 | n.i.1516 |
| 1563 | 1099 | moscatel, floral, dulce | 43 | 65 | linalool [2] |
| 1623 | | papel, desagradable, pepino, aldehído | 31 | 38 | n.i.1623 |
| 1696 | | dulce, fresco | | 33 | n.i.1696 |
| 1722 | | madera, fresco, verde | | 30 | n.i.1722 |
| 1767 | | verde, gomoso | 31 | | n.i.1767 |
| 2100 | | estiércol, caballo | | 31 | n.i.2100 |
| 2193 | | dulce, floral, verde | 38 | 46 | n.i.2193 |
| 2227 | | dulce, jabón, curry | 35 | | n.i.2227 |
| 2305 | | pimienta negra, planta seca, naftalina | | 35 | n.i.2305 |
| 2377 | | alcanfor, jabón, especiado | 30 | | n.i.2377 |

[1] = Descriptor, IR en DB-WAX y espectro de masas adquirido en GC-MS cuadran con la bibliografía empleada. [2] = Descriptor, IR en DB-WAX, VF-5ms y espectro de masas adquirido en GC-MS cuadran con la bibliografía empleada. n.i. = compuesto no identificado con su correspondiente IR en DB-WAX.

En este estudio nos hemos centrado en intentar identificar las zonas de olor con una FM superior a 40, ya que tienen más peso en el aroma global de la muestra.

Para intentar identificar el compuesto responsable de estas zonas del olor se consultó con una serie de bibliotecas de compuestos (NIST) con el fin de encontrar un odorante similar en IR y descriptor a las zonas de olor detectadas en este estudio. Para hacer una identificación aún más fiable se estudió los espectros de masas de los picos presentes en las zonas del olor, lo que nos permitió identificar el α -pineno (Fig. 19 y 20), canfeno (Fig. 21 y 22), 3-metilbutirato de etilo (Fig. 23 y 24), eucaliptol (Fig. 25 y 26) y linalool (Fig. 27 y 28)

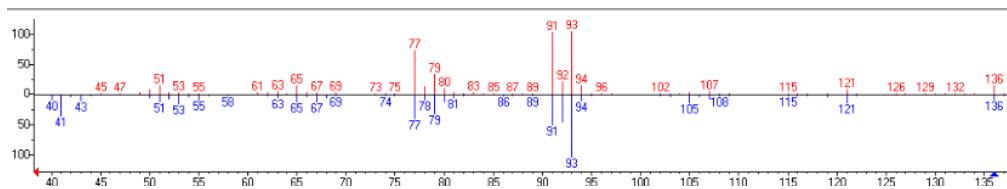


Fig. 19. Comparación del espectro de masas del compuesto IR 1020 (superior) en el extracto de la flor de cannabis con el espectro del α -pineno (inferior)

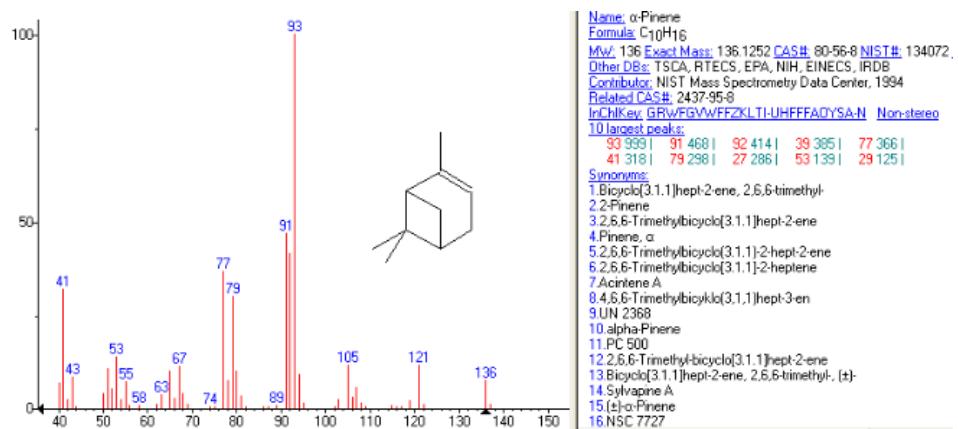


Fig. 20. Espectro de masas del α -pineno

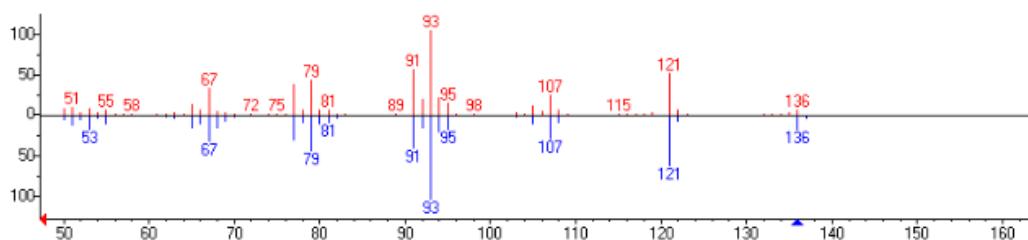


Fig. 21. Comparación del espectro de masas del compuesto IR 1061 (superior) en el extracto de la flor de cannabis con el espectro del canfeno (inferior)

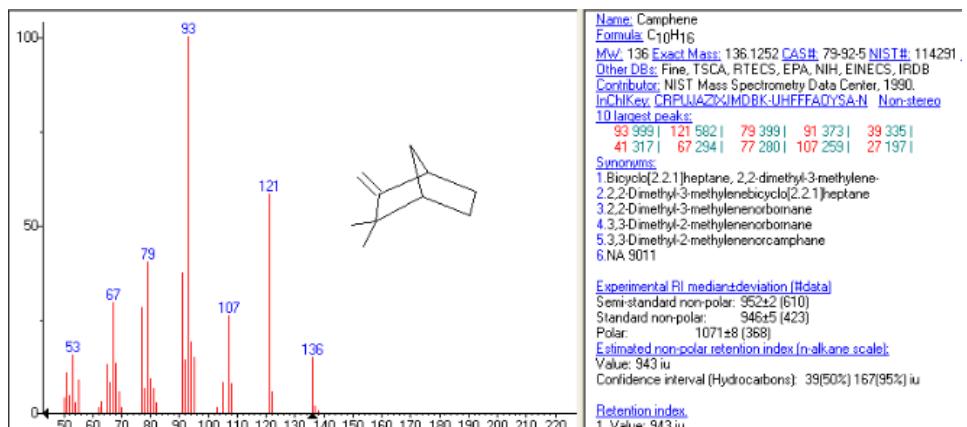


Fig. 22. Espectro de masas del canfeno

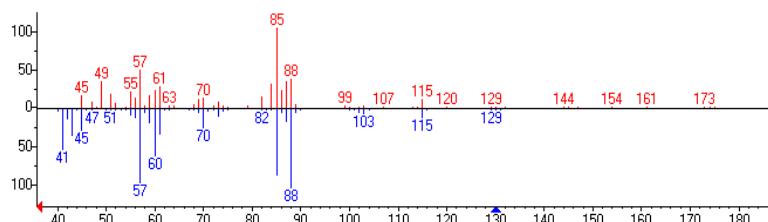


Fig. 23. Comparación del espectro de masas del compuesto IR 1076 (superior) en el extracto de la flor de cannabis con el espectro del 3-metilbutirato de etilo

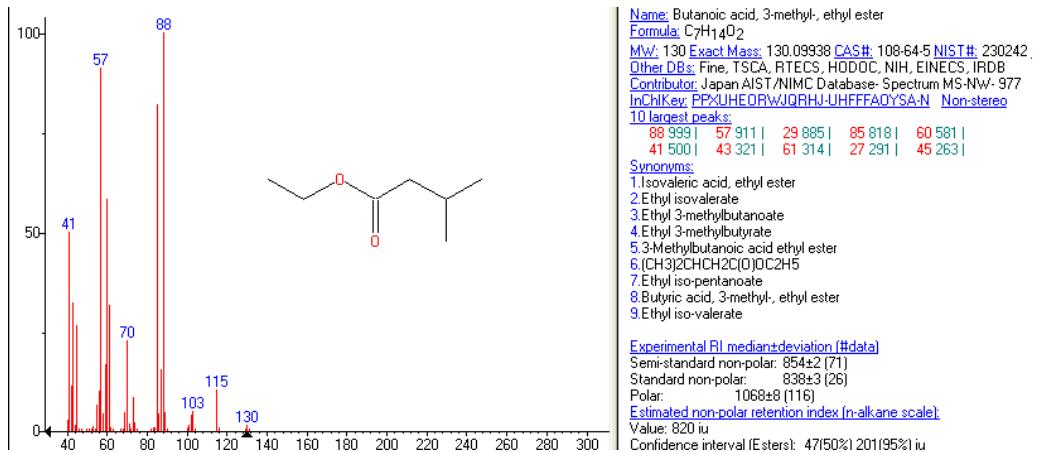


Fig. 24. Espectro de masas del 3-metilbutirato de etilo

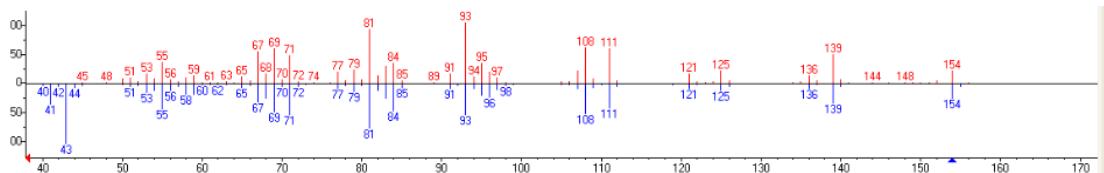


Fig. 25. Comparación del espectro de masas del compuesto IR 1212 (superior) en el extracto de la resina de hachís con el espectro del eucaliptol (inferior)

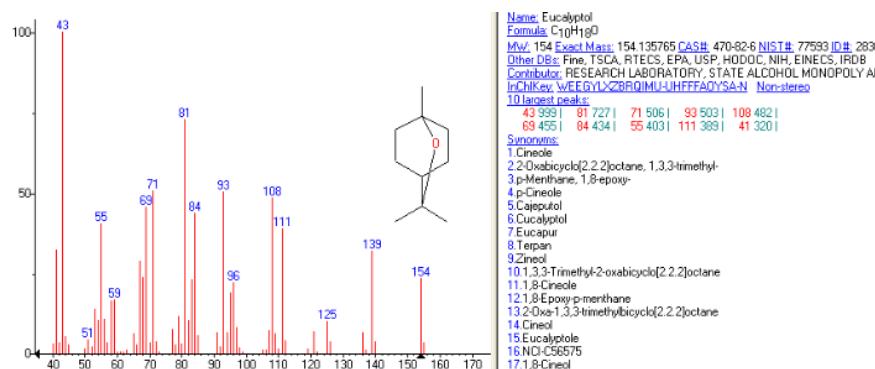


Fig. 26. Espectro de masas del eucaliptol

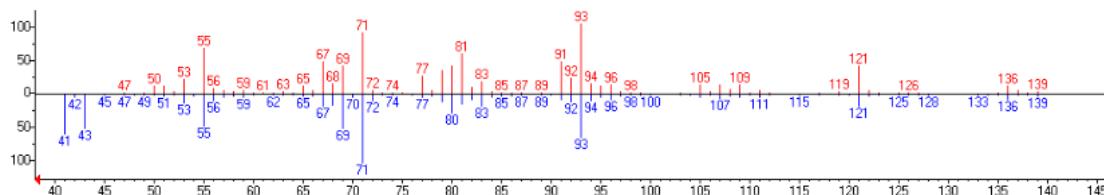


Fig. 27. Comparación del espectro de masas del compuesto IR 1563 (superior) en el extracto de la flor de cannabis con el espectro del 3-metilbutirato de etilo

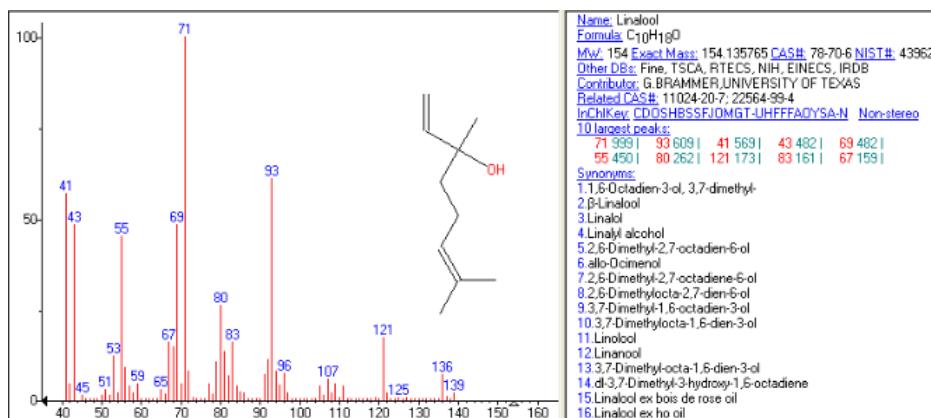


Fig. 28. Espectro de masas del linalool

Sin embargo, los compuestos responsables de las zonas de olor con un IR de 1172 y 1443 en DB-WAX no pudieron ser identificados por las técnicas anteriormente mencionadas (la zona de olor con un IR de 1172 podía ser generada tanto por el β -pineno como por el mirceno, ya que tienen un IR en DB-WAX y un descriptor muy similar, mientras que en la zona de olor de 1443 no se encontró ningún pico identifiable), ya que ambas zonas de olor estaban presentes en los dos tipos de muestra se recurrió al empleo de la cromatografía multidimensional en uno de los dos extractos (se decidió realizarlo en el de la flor por poseer mayor FM) para completar los datos ya obtenidos.

4.2. Resultados GC-O-FID-GC-O-MS

La aplicación de esta metodología de análisis permitió la identificación inequívoca de la zona de olor n.i. 1172 gracias a la criofocalización del analito con CO₂ y a su posterior estudio por espectrometría de masas (Fig. 24) obteniendo como identificación más probable el mirceno.

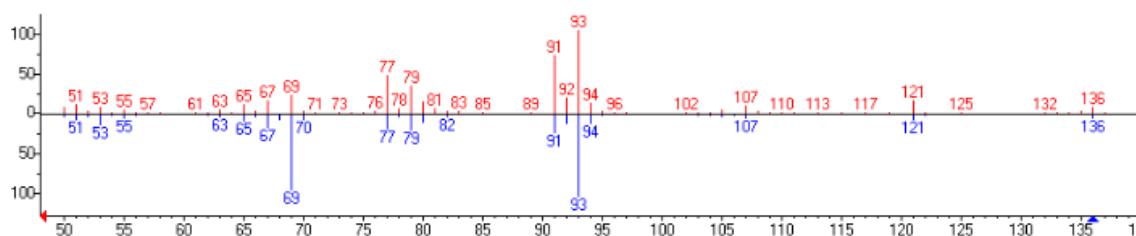


Fig. 29. Comparación del espectro de masas del compuesto IR 1172 (superior) en el extracto de la flor de cannabis con el espectro del mirceno

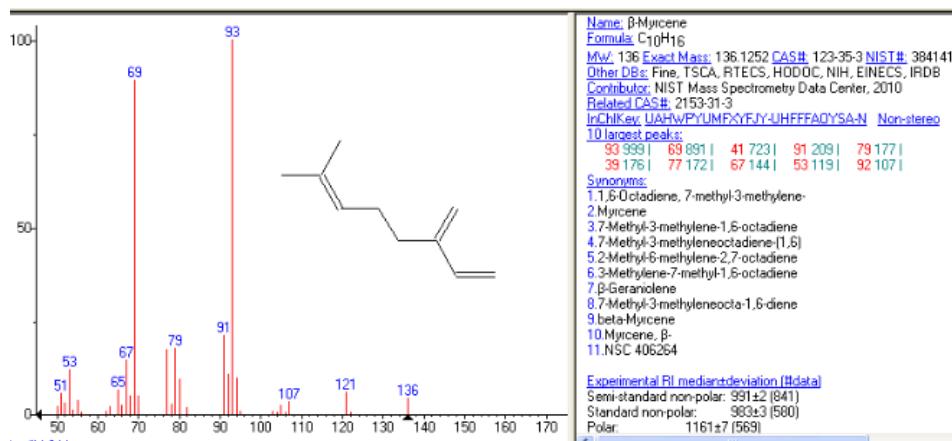


Fig. 30. Espectro de masas del mirceno

Sin embargo, en la zona del olor n.i. 1443, a pesar de realizar una inyección en el equipo dual de 10 µL y de lograr una detección sensorial (por olfatometría) en las dos columnas no se alcanzó el límite de detección en el espectrómetro de masas, por lo que en el cromatograma no había ningún pico observable y como consecuencia no se logró una identificación por este procedimiento.

Los resultados obtenidos hasta este estudio quedan recogidos en la Tabla 2:

Tabla 2. Resultados GC-GC-MS

| IR DB- wax | IR VF- 5ms | Descriptores | FM flor cannabis | FM resina hachís | Identificación |
|------------------|------------------|--|---------------------|---------------------|------------------------------|
| 1020 | 935 | resina, pino | 53 | 31 | α-pineno [2] |
| 1061 | | fresa, dulce, licoroso | 53 | | canfeno [1] |
| 1076 | 850 | dulce, aspirina, anís | 61 | | 3-metilbutirato de etilo [2] |
| 1172 | 986 | Geranio | 93 | 35 | mirceno [2] |
| 1191 | | madera, paja | | 36 | n.i.1191 |
| 1212 | | herbal, menta | | 41 | eucaliptol [1] |
| 1363 | | madera, herbal, floral, dulce | | 30 | n.i.1363 |
| 1443 | 1070 | característico cannabis | 78 | 85 | n.i.1443 |
| 1516 | | papel, herbal, verde, plástico, grasa | 43 | 65 | n.i.1516 |
| 1563 | 1099 | moscatel, floral, dulce | 43 | 65 | linalool [2] |
| 1623 | | papel, desgradable, pepino, aldehído | 31 | 38 | n.i.1623 |
| 1696 | | dulce, fresco | | 33 | n.i.1696 |
| 1722 | | madera, fresco, verde | | 30 | n.i.1722 |

| | | | | | |
|------|--|---------------------------------------|----|----|----------|
| 1767 | | verde, gomoso | 31 | | n.i.1767 |
| 2100 | | estiércol, caballo | 31 | | n.i.2100 |
| 2193 | | dulce, floral, verde | 38 | 46 | n.i.2193 |
| 2227 | | dulce, jabón, curry | 35 | | n.i.2227 |
| 2305 | | pimienta negra, planta seca naftalina | | 35 | n.i.2305 |
| 2377 | | alcanfor, jabón, especiado | 30 | | n.i.2377 |

4.3. Resultados del análisis del extracto sólido-líquido fraccionado

La insuficiente señal obtenida en el espectrómetro de masas para el pico de interés hizo necesaria la obtención de un extracto más concentrado, por lo que se recurrió a una extracción sólido-líquido de la flor de cannabis y un posterior fraccionamiento en columna de sílica (explicado con detalle en el punto 3.7). El estudio sensorial de estas fracciones queda recogido en la Tabla 3:

Tabla 3. Estudio de las fracciones

| nº | Aroma | nº | Aroma | nº | Aroma | nº | Aroma |
|----|----------|----|-----------|----|-----------------|----|----------------|
| 1 | Sin olor | 6 | Con olor* | 11 | Sin olor | 16 | Característico |
| 2 | Geranio | 7 | Con olor* | 12 | Pegamento | 17 | Característico |
| 3 | Sin olor | 8 | Sin olor | 13 | Cítrico, floral | 18 | Resinoso |
| 4 | Sin olor | 9 | Sin olor | 14 | Cítrico | 19 | Cedro |
| 5 | Sin olor | 10 | Sin olor | 15 | Resinoso | 20 | Campo |

De las 20 fracciones obtenidas, las fracciones 16 y 17 fueron consideradas relevantes para este estudio al poseer el descriptor “característico”. Inicialmente fueron estudiadas por GC-MS, pero a pesar del fraccionamiento aplicado no se logró un aislamiento adecuado del compuesto responsable de la zona de olor n.i.1443. Sin embargo, en la fracción 17 si pudo identificarse la presencia de cis-sabidieno hidrato (Fig.31).

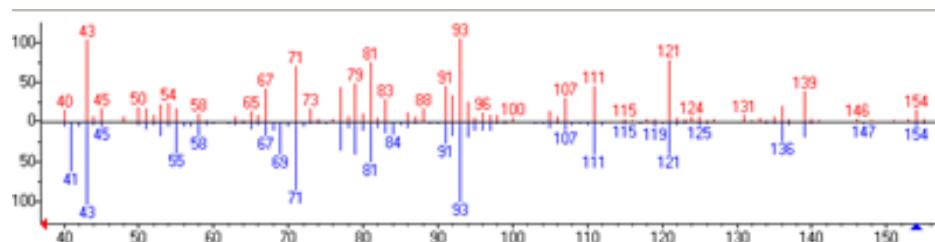


Fig. 31. Comparación del espectro de masas del compuesto encontrado cerca del IR 1443 (superior) en el extracto de la flor de cannabis con el espectro del cis-sabidieen hydrate

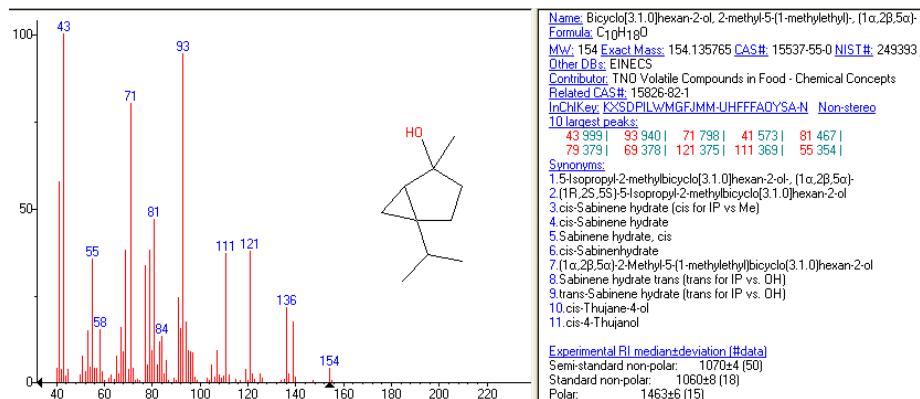


Fig. 30. Espectro de masas del cis-sabideine hydrate

El patrón de compuesto está disponible comercialmente, por lo que se adquirió para hacer un estudio de su aroma y compararlo con el olor característico del cannabis. Se prepararon dos disoluciones: 38.68 mg/L y 66.5 μ g/L para estudiar el aroma generado a estas concentraciones, se aplicó una gota de estas disoluciones a una tira de olfacción, se esperó a que se evaporara el disolvente y se estudió el aroma resultante de la tira. El estudio sensorial de estas disoluciones demostró que el cis-sabidieno hidrato no genera el olor característico a estas concentraciones, por lo que se confirma que no es el compuesto buscado.

Con la aplicación de la cromatografía multidimensional (GC-O-FID-GC-O-MS) a la fracción 16 se logró obtener el espectro de masas del compuesto responsable del aroma característico de estas muestras (Fig. 31). Sin embargo, no se logró identificar este compuesto por comparación con las librerías de espectros (NIST y Wiley 7).

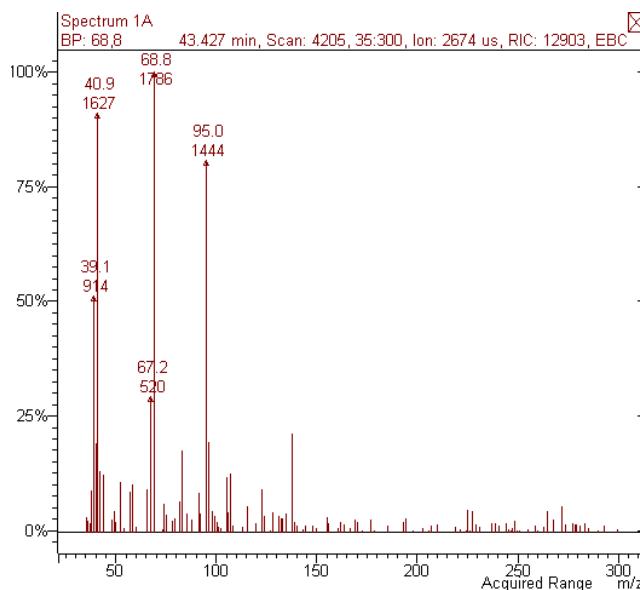


Fig. 31. Espectro de masas del compuesto n.i.1443

4.4. Resultados de la extracción selectiva de grupos mercapto

Tras el estudio por GC-O y GC-MS de este extracto no se obtuvo ninguna información relevante que ayudara a identificar la zona de olor objetivo (n.i.1443), ya que no se encontró

exactamente este olor en el estudio GC-O. Esto seguramente se deba a que el compuesto responsable de esta zona de olor no tenga grupos tiol y por tanto no haya sido extraído por esta técnica.

4.5. Comparación con estudios anteriores y entre los dos tipos de muestra

Ha habido múltiples estudios previos de los distintos terpenos y componentes volátiles presentes en estos tipos de muestras, como los estudios realizados por Marchini⁶, Wiebelhaus⁷, Booth⁸ y Rice⁹. En ellos se encontraron múltiples compuestos, algunos de los cuales hemos identificado en este estudio como influyentes en el aroma de estas muestras, como el α -pineno, el mirceno y el linalool (los cuales son odorantes presentes en ambos tipos de muestras).

A la vista de los resultados obtenidos en los apartados anteriores se puede apreciar la gran influencia del odorante n.i.1443 en el aroma característico de este tipo de muestras. Este odorante se encuentra en ambas muestras con una FM muy similar y elevada (78 en la flor de cannabis y 85 en la resina de hachís). Esto explica el gran parecido en el aroma general de estas muestras. Sin embargo, hay múltiples diferencias secundarias en los perfiles aromáticos de la flor de cannabis y la resina de hachís: algunas de las zonas de olor encontradas en los dos tipos de muestra poseen una mayor FM en el extracto de flor de cannabis (α -pineno y mirceno, de FM 53 y 93 en la flor con respecto a 31 y 35 encontrados en la resina, respectivamente). También se han encontrado zonas de olor solo presentes en el extracto de flor de cannabis (canfeno, 3-metilbutirato de etilo, n.i.1767, n.i.2227 y n.i.2377). Estas diferencias pueden deberse a la pérdida total o parcial de los odorantes responsables de estas zonas de olor en el procesado del hachís, obtenido por compresión manual o mecánica de la resina de la flor de cannabis, por lo que se puede sospechar que estos odorantes se encuentran total o parcialmente en la corteza u otras partes de la flor no relacionadas con la resina. Por el contrario, hay otras zonas de olor con una mayor FM en el extracto generado a partir de resina de hachís (n.i.1516, linalool, n.i.1623 y n.i.2193, de FM 43, 43, 31 y 38 en la flor con respecto a 65, 65, 38 y 46 encontrados en la resina, respectivamente). Esto puede deberse a un enriquecimiento de los odorantes responsables de estas zonas de olor en el procesado de hachís. Por último, hay determinadas zonas de olor (n.i.1191, eucaliptol, n.i.1363, n.i.1696, n.i.1722, n.i.2100 y n.i.2305) las cuales solo se encontraron en el extracto de resina de hachís. La aparición de estos compuestos puede estar relacionada con la incorporación de determinados aditivos durante el procesado del hachís. También podría deberse a una concentración de estos odorantes en el procesado, produciendo que pasen de estar por debajo de los límites de olfacción en la planta a ser perceptibles en el hachís.

5. Conclusiones

En este trabajo se ha realizado por primera vez una caracterización de los principales odorantes presentes en la flor de cannabis y resina de hachís mediante el empleo de diversas técnicas de extracción (HS-SPE, extracción sólido-líquido y extracción líquido-líquido con sales de mercurio), de separación (fraccionamiento en columna de sílica), separación con screening sensorial (GC-O) y técnicas de separación-identificación (GC-MS y GC-O-FID-GC-O-MS). La aplicación secuencial o simultánea de estas técnicas ha permitido describir el perfil aromático de las muestras, siendo la zona de olor n.i.1443 la más influyente en el aroma de estas muestras junto con la zona aromática generada por el mirceno en la flor. También ha permitido identificar varios odorantes, como el α -pineno, el 3-metilbutirato de etilo, el canfeno, el eucaliptol y el linalool. En el estudio de estos perfiles aromáticos se han observado diferencias entre los dos tipos de muestras, con una variación general de la FM de las zonas de olor de una muestra a otra. Se ha podido ver que para el alfa-pineno y el mirceno son superiores en la flor y para el linalool es superior en la resina. Sin embargo, el 3-metilbutirato y el canfeno solo están presentes en la flor, mientras que el eucaliptol solo está presente en la resina.

Con la aplicación de este trabajo se han aprendido múltiples técnicas experimentales de separación, extracción y análisis, las cuales pueden ser aplicadas no solo para el análisis de aromas, sino para cualquier trabajo de investigación.

6. Bibliografía

1. San-Juan, F.; Pet'ka, J.; Ferreira V.; Escuero, A. Producing headspace extracts for the gas chromatography-olfactometro evaluation of wine aroma, *Food Chem.* **2010**, 03, 129-137.
2. Saenz-Navajas, M.P.; Alegre, Y.; de-la-Fuente, A.; Ferreira, V.; García, D.; Eizaguirre, S.; Razquin, L. Rapid sensory-directed methodology for the selection of high-quality aroma wines, *J. Sci. Food and Agric.* **2016**, 10, 1002-1012.
3. Zhu, J.C.; Wang, L.Y.; Xiao, Z.B.; Niu, Y.W. Characterization of the key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography-olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and flame photometric detection (FPD), *Food Chem.* **2018**, 245, 775-785.
4. Benn, S.M.; Peppard, T.L. Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis, *Food Chem.* **1996**, 44, 557–566.
5. Engel, W.; Bahr, W.; Peter, S. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices, *Eur. Food Res. and Technol.* **1999**, 209, 237–241.
6. Marchini, M.; Charvoz, C.; Dujourdy, L.; Baldovini, N.; Filippi, J.J. Multidimensional analysis of cannabis volatile constituents: Identificación of 5,5-dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane as a volatile marker of hashish, the resina of Cannabis sativa L, *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1370, 200-215.
7. Wiebelhaus, N.; D'Nisha H.; Natasha, M., Kreitals; J.R. Almirall. Differentiation of marijuana headspace volátiles from other plants and hemp products using capillary microextraction of volátiles (CMV) coupled to gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *Forensic Chem.* **2016**, 2, 1-8.
8. Booth J.K.; Page J.E.; Bohlmann, J. Terpen synthases from Cannabis sativa, *PLoS One.* **2017**, 12, 1-20.
9. Rice, S.; Koziel, J.A. Characterizing the Smell of Marijuana by Odor Impacto f Volatile Compounds: An Application of Simultaneous Chemical and Sensory Analysis, *PLoS One.* **2015**, 10, 1371-1388.
10. Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Identifi®cation of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one from the Box Tree (*Buxus sempervirens* L.) and Broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Koch.), *Flavour Fragrance J.* **1997**, 12, 373-376.
11. Dravnieks, A. In *Atlas of odor character profiles*, 1^a ed. ASTM: Philadelphia, **1985**; Vol 61, p 1-354.