



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Identificación de compuestos orgánicos volátiles en
aire respirado mediante Microextracción en Fase Sólida
y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría
de Masas**

Laura Covadonga Rodas Sánchez

Julio 2015, Oviedo

ÍNDICE	Pág.
1. Introducción.....	1
1.1. Definición de aire exhalado.....	1
1.1.1. Compuestos Orgánicos volátiles (VOCs).....	2
1.2. Evolución del estudio de aire exhalado.....	3
1.3. Cáncer de pulmón.....	5
1.3.1. Diagnóstico de cáncer de pulmón en clínica.....	6
1.3.2. Diagnóstico del cáncer empleando perros.....	7
1.4. Análisis de aire exhalado.....	8
1.4.1. Muestreo.....	8
1.4.2. Preconcentración de la muestra.....	10
1.4.3. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	12
1.4.3.1. GC-MS con fuente de ionización electrónica.....	13
1.4.3.2. GC-C-IRMS.....	15
2. Objetivo.....	17
3. Experimental.....	18
3.1. Instrumentación.....	18
3.2. Reactivos.....	19
3.3. Materiales.....	19
3.4. Procedimientos.....	20
3.4.1. Toma de muestra y preconcentración.....	20
3.4.2. Identificación de los compuestos presentes en el aire exhalado humano.....	21
3.4.3. Estudio de la reproducibilidad y reutilización de las bolsas Tedlar.....	22
3.4.4. Estudio de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (relaciones isotópicas relativas) de los compuestos presentes en el aire exhalado.....	23
3.4.5. Estudio de las variaciones en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en los compuestos de aire exhalado tras la ingesta de glucosa marcada en ^{13}C	25
4. Resultados y discusión.....	26
4.1. Identificación de los compuestos presentes en el aire exhalado humano.....	26

4.1.1. Empleo de la columna HP-PLOT.....	26
4.1.2. Empleo de la columna DB-5MS.....	29
4.2. Estudio de la reproducibilidad y reutilización de las bolsas Tedlar.....	37
4.3. Estudio de las relaciones isotópicas relativas de carbono en los compuestos de aire exhalado.....	39
4.4. Estudio de las variaciones en los valores $\delta^{13}\text{C}$ tras la ingesta de glucosa marcada en ^{13}C	44
5. Conclusiones.....	48
6. Bibliografía.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Laboratorio de Lavoisier en el que se muestra como se empleaba la trampa aire.....	3
Figura 2. Bolsa de tipo Tedlar y ampliación de la boquilla de muestreo donde se puede observar el septum donde se puede introducir una jeringa muestreadora.....	9
Figura 3 Esquema de un dispositivo comercial de fibra SPME.....	11
Figura 4 Acoplamiento de la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas con fuente de ionización electrónica.....	13
Figura 5 Esquema de una fuente de ionización electrónica.....	14
Figura 6 Esquema del equipo GC-C-IRMS.....	15
Figura 7 Montaje experimental para realizar la preconcentración de los analitos utilizando una bolsa Tedlar y SPME.....	20
Figura 8 Esquema de una sección transversal de la columna HP-PLOTQ.....	26
Figura 9 a) Cromatograma GC-MS obtenido en modo SIM con la columna HP-PLOTQ de una muestra de aire exhalado b)Ampliación del cromatograma anterior desde 0 a 25 minutos para la identificación de los VOCs minoritarios presentes en la muestra de aire exhalado.....	28
Figura 10 Esquema de una sección transversal de la columna DB-5MS.....	29
Figura 11 Cromatograma GC-MS obtenido en modo barrido o SCAN para una muestra de aire exhalado utilizando la columna DB-5MS.....	31
Figura 12 Ampliación del cromatograma GC-MS de la Figura 11 a) desde 2 a 11 minutos, b) desde 20 a 30,5 minutos y c) desde 31 a 43 minutos para la identificación visual de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario separados con la columna DB-5MS.....	32
Figura 13 Cromatograma GC-MS obtenido en modo barrido o SCAN para una muestra de aire exhalado utilizando dos columnas DB-5MS de 30 m acopladas en serie.....	35
Figura 14 Ampliación del cromatograma GC-MS de la Figura 13 a) desde 6 a 21 minutos, b) desde 30 a 40 minutos, c) desde 45 a 60,5 minutos y d) desde 60 a 70 minutos para la identificación visual de los VOCs separados con dos columnas de 30 m DB-5MS acopladas en serie.....	36

Figura 15	Superposición de cromatogramas GC-MS obtenidos en modo barrido o SCAN para las tres bolsas empleadas para el estudio de la reproducibilidad de las bolsas Tedlar, estando las tres rellenas del aire exhalado del mismo voluntario.....	38
Figura 16	Superposición de cromatogramas GC-MS obtenidos en modo barrido o SCAN para la misma bolsa (bolsa 1) en su primer uso y tras su reutilización, estando en ambas ocasiones rellena del aire exhalado del mismo voluntario.....	38
Figura 17	Cromatograma GC-C-IRMS obtenido en una muestra de aire exhalado utilizando la columna de DB-5MS de 30 m para una muestra de aire exhalado.....	39
Figura 18	Ampliación del cromatograma GC-C-IRMS de la Figura 17 a) desde 0 a 740 s, b) desde 700 a 1500 s, c) desde 1700 a 2900 s y d) desde 2900 a 2340 s para la identificación visual de los VOCs en el aire separados con una columna DB-5MS de 30 m. Se resaltan con una flecha los compuestos presentes en el aire exhalado que no se detectaron en el blanco de la bolsa analizado previamente.....	40
Figura 19	Valores orientativos de $\delta^{13}\text{C}$ relativos al PDB.....	42
Figura 20	Estructura de la glucosa marcada universalmente marcada en ^{13}C que se administró al voluntario para realizar la medida de su aire exhalado tras la ingestión.....	44
Figura 21	Tendencia en los valores en $\delta^{13}\text{C}$ de los VOCs que eluyen a los tiempos de retención 165 s, 1489 s, 3313 s, 1529 s.....	46

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1 Condiciones experimentales empleadas para la identificación de los analitos utilizando la columna HP-PLOTQ.....	21
Tabla 2 Condiciones experimentales empleadas para la identificación de los analitos utilizando la columna DB5-MS.....	22
Tabla 3 Identificación de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario empleando la columna HP-PLOTQ.....	27
Tabla 4 Identificación de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario empleando la columna de DB-5MS.....	30
Tabla 5 Identificación de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario empleando dos columnas DB-5MS de 30 m acopladas en serie.....	33
Tabla 6 Valores $\delta^{13}\text{C}$ de los VOCs procedentes de la muestra de aire exhalado empleando el equipo GC-C-IRMS.....	41
Tabla 7 Relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los VOCs procedentes de la muestra de aire exhalado empleando el equipo GC-C-IRMS.....	43
Tabla 8 Variaciones en el valor $\delta^{13}\text{C}$ de los VOCs tras la ingesta de glucosa universalmente marcada en ^{13}C en los distintos periodos de tiempo en los cuales se realizó el muestreo del aire exhalado al voluntario.....	41

1. Introducción

Los principales métodos analíticos para el diagnóstico o monitorización de enfermedades, se basan en un análisis de sangre o de orina. El análisis del aliento humano no está tan implantado en la práctica clínica, sin embargo, ofrece ventajas frente a los métodos convencionales ya que es barato y, al no ser invasivo, es seguro para el paciente [1,2]. La determinación de compuestos de bajo peso molecular en los sistemas biológicos como células, órganos y organismos es especialmente importante en estudios metabólicos. Mediante la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, *Volatile Organic Compounds*) en aliento humano es posible desarrollar herramientas de diagnóstico de enfermedades [3]. La respiración se realiza aproximadamente 20,000 veces al día y contiene más de 3,000 sustancias diferentes lo que supone una fuente muy importante de posibles biomarcadores. Esto le otorga un gran potencial para el diagnóstico de enfermedades, y para la evaluación de la exposición a contaminantes ambientales o drogas [4,5].

1.1 Definición de aire exhalado

El aire exhalado humano es una mezcla compleja de compuestos volátiles y no volátiles que se producen cuando el aire ambiental inhalado se expulsa de los pulmones a través de los bronquios, tráquea y cavidades nasales y orales [6]. La composición del aliento está determinada casi exclusivamente por la composición del gas inhalado, aunque varía considerablemente de unos humanos a otros como resultado de la fisiología pulmonar. El aire ambiental cambia cuando es inhalado, convirtiéndose mayoritariamente en dióxido de carbono y también al ponerse en contacto con gotas de mucosa oral o nasal del revestimiento epitelial [7]. A parte del CO₂, los componentes principales del aire exhalado son el vapor de agua, hidrógeno, amoníaco, monóxido de carbono y metano, estos tres últimos en una concentración del rango de las partes por trillón (ppt). El aliento contiene también trazas de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como acetona, metanol, y etanol [6].

1.1.1 Compuestos Orgánicos volátiles (VOCs)

Los compuestos volátiles, la mayoría de naturaleza orgánica, VOCs, son continuamente generados por el cuerpo humano y particularmente emitidos vía aire exhalado y a través de la piel. Los VOCs son también liberados por la sangre, orina y muestras fecales. Estos compuestos, a menudo referidos como metabolitos orgánicos o biomarcadores, han llamado la atención de médicos, fisiólogos y cirujanos como herramientas potenciales para el diagnóstico clínico y monitorización terapéutica de enfermedades. Para comprender el complejo campo de análisis de VOCs en el aliento humano es necesario identificar las estructuras relevantes de los pulmones. Los pulmones contienen un volumen tisular total de 1800 mL los cuales puede contener otros 2400 mL de gas. Este volumen está distribuido entre los distintos compartimentos: 250-300 mL en las paredes alveolares, 60-80 mL en el epitelio, 50-70 mL en el endotelio, 100-185 mL en el intersticio, 50 mL en los micrófagos alveolares, 250 mL en los tejidos de soporte y 400 mL del sistema capilar sanguíneo. Los tejidos circundantes abarcan sobre 900 mL del volumen. Teóricamente los VOCs se producen en distintas partes del cuerpo, entran en el flujo sanguíneo y se transportan a través del cuerpo. Estos compuestos se transfieren de la sangre a los alveolos y finalmente son exhalados en el aliento [6].

Se han hecho múltiples estudios, donde se han distinguido entre sujetos con cáncer de pecho, pulmón, cáncer de colon y grupos de control sanos, basados en la detección de VOCs en el aliento. Se encontró que aunque no pueden identificarse estructuras químicas específicas o el origen de los VOCs, es plausible que estos puedan introducirse en el espacio alveolar por la vascularización periférica [6,8].

Otra hipótesis reciente es que los VOCs observados en el aliento humano pueden ser directamente originados en las células epiteliales que recubren la superficie de los pulmones/bronquios o ser introducidos desde otros tejidos. El intercambio de gases en los pulmones ocurre entre los alveolos y la sangre de los capilares pulmonares. La sangre es una mezcla extremadamente compleja que es única para cada individuo y que su composición depende de muchos factores como puede ser la genética, el entorno o la dieta. Algunos compuestos volátiles que se disuelven en la sangre se pueden volver a volatilizar en el aire exhalado y pueden contribuir a la composición química total del

aire exhalado. Por lo tanto, la variedad de volátiles minoritarios en el aliento puede ser asombrosa, y esto hace que el análisis químico sea muy complejo [6].

1.2 Evolución del estudio del aire exhalado

La detección de compuestos orgánicos volátiles en el aliento tiene una larga historia. Desde tiempos de Hipócrates (460 a.C.- 370 a.C.), los médicos se percataron de que el olor del aliento humano podía proporcionar pistas sobre el diagnóstico. Un olor dulce y frutal de acetona alertaba al médico de una diabetes incontrolada, un olor a pescado rancio resultaba característico de una enfermedad hepática avanzada, el olor a orina podía ser inherente a un fallo renal o el olor a podrido podía ser propio de un absceso pulmonar [9].

El análisis de los componentes químicos en el aire exhalado se abordó hace más de 200 años. Antonie Laurent Lavoisier conocido como padre de la “revolución química”, fue pionero en estos análisis. Fue en 1784 cuando él y Pierre Simon Laplace descubrieron que los animales consumían oxígeno y expiraban dióxido de carbono. Su equipo de investigación creó un dispositivo que acumulaba y concentraba los componentes del aliento. En la *Figura 1* se muestra una ilustración del laboratorio de Lavoisier, donde el sujeto (a la izquierda) respiraba por el tubo y el químico francés (en el centro) estudiaba la respiración, mientras Madame Lavoisier (a la derecha) recogía los datos obtenidos [10].

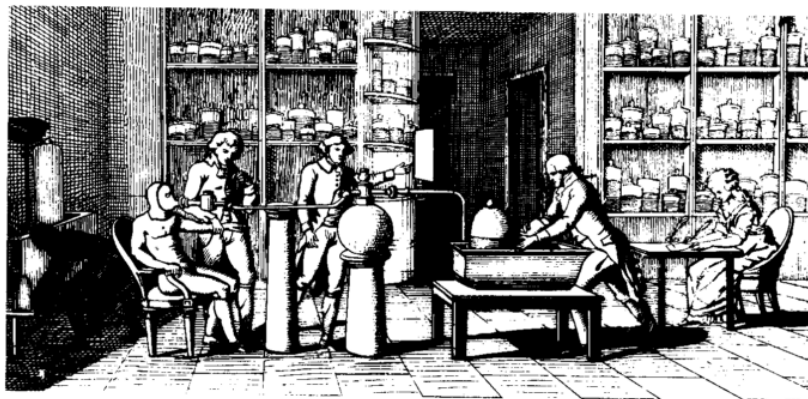


Figura 1: Laboratorio de Lavoisier en el que se muestra como se empleaba la trampa de aire.

Con esta trampa se conseguía detectar de una forma sencilla el dióxido de carbono, ya que representa casi el 5% del aire exhalado. Desafortunadamente la mayor parte de compuestos volátiles, al encontrarse en concentración mucho menor, no se pudieron detectar hasta mediados del siglo XIX, cuando se introdujeron los ensayos colorimétricos [10].

En 1874 el médico inglés Francis E. Anstie empleó los análisis colorimétricos para el estudio del alcohol en el cuerpo humano a través del aliento. Su objetivo era resolver la controversia entre los fisiólogos, quienes creían que el alcohol seguía el mismo ciclo que la comida, y los activistas, que creían que el cuerpo excretaba el alcohol como si fuera una sustancia extraña. La trampa de aire de Anstie contenía una disolución de ácido crómico, que cambiaba de color rojo-amarronado a verde en presencia de alcohol. Con este experimento se demostró que la mayor parte del alcohol se excreta por vía respiratoria y las otras rutas son minoritarias. Por lo tanto, la mayor parte del alcohol debía ser metabolizado [9].

Nebelthau, un médico de la policlínica de Marburg en Alemania, construyó en 1897 un dispositivo para analizar el aliento de pacientes que sufrían diabetes mellitus. Cuando esta enfermedad está descontrolada se produce un incremento de glucosa en la sangre hasta niveles elevados y como resultado el cuerpo genera unas cantidades elevadas de acetona como metabolito mayoritario [9,10].

Los análisis de aire exhalado también fueron empleados para identificar daños en el páncreas por el doctor Johns Hopkins (1795-1873) o para la detección de desórdenes estomacales como úlceras pépticas o gastritis crónica. Estos estudios los llevó a cabo Barry J. Marshall, de la Universidad de Virginia, consiguiendo con ellos el descubrimiento de la *Helicobacter pylori*, bacteria responsable de úlceras estomacales y causante del cáncer de estómago y del linfoma gástrico (1982) [9].

Sin embargo, fue Linus Pauling quien, en 1971, empleó una trampa para concentrar VOCs en el aire exhalado y encontró que el aliento de un humano sano estaba compuesto por cientos de compuestos distintos en bajas concentraciones [11]. Este estudio permitió la identificación de más de 250 sustancias en una muestra de aire, demostrándose que las fluctuaciones entre una persona y otra eran significativas. Una persona con una dieta controlada tenía una desviación en los picos alrededor del 10 %

tras cuatro días de dieta, mientras que una persona sin controlar daba fluctuaciones considerablemente mayores [12].

A partir de entonces se ha investigado sobre los componentes endógenos y exógenos del aire exhalado como producto del metabolismo enzimático para la determinación de enfermedades infecciosas o para la predicción del riesgo de cáncer. A pesar de la gran investigación en las cuatro últimas décadas, solamente un par de test de aliento se han aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos. Estos pueden dividirse en dos grupos [13]:

- Detección de VOCs en aliento humano para la detección de estrés oxidativo causado por enfermedades. Por ejemplo: test de NO para la detección y monitorización de asma.
- Análisis de $^{13}\text{CO}_2$ como biomarcador *in vivo* en aire exhalado para el diagnóstico de deficiencias enzimáticas o infecciones después de la digestión de ^{13}C en sustratos. Por ejemplo, el test de ^{13}C para el diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*.

El análisis a tiempo real del aire exhalado es un campo de investigación en auge. El objetivo principal es la detección de las concentraciones de metabolitos traza por debajo del nivel de las partes por billón (ppb) en el laboratorio, y en última instancia, trasladar estos análisis directos desde el laboratorio a la práctica clínica. En la actualidad se realizan estudios sobre la recolección de muestras, tratamiento y análisis de compuestos químicos en enfermedades relacionadas con los pulmones, hígado, riñones, diabetes, pecho o con procesos de estrés oxidativo que están implicados en una variedad de enfermedades prioritarias [14,15].

1.3 Cáncer de pulmón

La mortalidad causada por el cáncer parece ser el problema de salud más importante en la sociedad moderna. El cáncer más común en el mundo es el cáncer de pulmón con 1.6 millones de nuevos casos diagnosticados cada año [16]. Además es uno de los más agresivos, siendo la mayor causa de muerte en hombres y mujeres en los países industrializados. Los factores predominantes en el desarrollo del cáncer de pulmón son

el tabaquismo activo y pasivo, ya que se estima que un cigarrillo contenga más de 4,800 sustancias distintas de las cuales más de 200 sustancias son mutagénicas y carcinogénicas [17]. Otros factores para el desarrollo de este cáncer son la exposición a radón, cadmio, arsénico, berilio, y asbestos. El cáncer de pulmón puede clasificarse en dos grandes grupos que determinan su tratamiento: SCLC (*Small Cell Lung Carcinoma*) (20-25% de los casos) y NSCLC (*Non-Small Cell Lung Carcinoma*) (70-75%). Cuando el diagnóstico es de SCLC con metástasis solo puede ser tratado con quimioterapia y radioterapia, siendo estos tratamientos muy agresivos [18]. Independientemente del subtipo histopatológico, el 88% de la mortalidad a los 5 años de cáncer de pulmón es asociado a un diagnóstico clínico tardío. La ausencia de síntomas en la enfermedad y los problemas debidos a los programas de detección hace que los pacientes presenten la enfermedad avanzada [19].

1.3.1 Diagnóstico del cáncer de pulmón en clínica

El diagnóstico precoz de cáncer de pulmón, es por tanto un objetivo muy importante en la investigación biomédica actual. Las técnicas empleadas actualmente son de cribado como: la radiografía de tórax, citología de saliva o tomografía computarizada. El uso de tomografía computarizada de baja dosis (*Computed Tomography*, CT), permite una buena detección de nódulos de baja densidad y potencialmente podría conducir a unas tasas de curación de la enfermedad. Esta técnica realiza un escaneo (*imaging*) de tórax empleando una unidad de CT móvil, de esta forma se obtienen imágenes donde se pueden observar características morfológicas, diferenciando así entre los nódulos benignos y malignos. Esta técnica mejora sustancialmente la supervivencia a 10 años para el cáncer de pulmón [19,20]. Sin embargo este método presenta algunos inconvenientes: el procedimiento es largo y desagradable para los pacientes, se requiere personal cualificado y los dispositivos empleados son caros [21]. Además, ninguna de las técnicas mencionadas ha sido recomendada por las organizaciones médicas profesionales para la detección temprana del cáncer de pulmón ya que no se han encontrado evidencias sustanciales [22].

Por lo tanto, no es sorprendente que las tasas de supervivencias a 5 años de otros tipos de cáncer, como puede ser el de mama o de colon, sea de 4 a 6 veces mayor que el de

cáncer de pulmón gracias a las técnicas de detección desarrolladas. Las tasas de supervivencia a 5 años en casos de cáncer de pulmón podrían llegar al 60 o 80% de los casos siempre y cuando se detectara en una etapa temprana [19].

1.3.2 Diagnóstico del cáncer empleando perros

Se sabe que los perros son capaces de detectar olores del cuerpo humano y de sustancias como explosivos o narcóticos. William y Church, en 1989, fueron los primeros en suponer que un perro sin entrenamiento podría ser capaz de advertir a su dueño de la presencia de un melanoma maligno. El perro que se estudió olía constantemente la pierna de su dueño. La lesión se extirpó y la histología mostró que se trataba de un melanoma maligno. Después de la extirpación el animal no mostró más interés en la pierna de su dueño [23,24].

En los últimos años se han realizado múltiples publicaciones en las que se discute la posibilidad de emplear perros entrenados para detectar diferentes tipos de enfermedades como melanoma, cáncer de pulmón, de pecho, de vejiga, de próstata o de ovarios a partir del olor que desprende un tejido de carcinoma, el aliento o la orina. Esta habilidad para rastrear varios olores simultáneamente depende del tamaño de los epitelios y las células olfativas. Por ejemplo un pastor alemán tiene más de 200 millones de células olfativas en un área aproximada de 170 cm², mientras que un humano tiene sobre 5 millones de células en 5 cm². Esto hace que los perros pueden detectar millones de especies moleculares diferentes, frente a un humano que solamente podría llegar a detectar entre 1000- 3000 olores distintos si posee una nariz entrenada (por ejemplo un perfumista) [18,25].

Es interesante tener en cuenta que algunos posibles biomarcadores pueden ser detectados por perros. De hecho, perros entrenados pueden distinguir entre muestras de aire exhalado de pacientes con cáncer diagnosticado de aquellas de personas sanas. Aunque estos animales puedan detectar umbrales tan bajos como partes por trillón de una manera simple y barata, no se puede conocer cuáles son los compuestos químicos a los que responden los perros [26,27].

1.4 Análisis de aire exhalado

Una vez se conozca la identidad de los biomarcadores volátiles de las enfermedades, y siempre que se puedan detectar o determinar con una exactitud y precisión aceptable, el protocolo a seguir para el análisis del aliento es el paso más importante para conseguir la implantación en medicina clínica. Los principales obstáculos son problemas técnicos, como el muestreo, preconcentración y el propio análisis, así como aspectos metodológicos básicos como la normalización y expresión de los datos [28].

1.4.1 Muestreo

La dilución, contaminación de las muestras y la pérdida de analitos durante el muestreo, ha dado lugar a una enorme variación de las concentraciones de sustancias en los diferentes estudios realizados [29]. Esto hace que la recolección de muestras gaseosas represente una de las etapas cruciales en el análisis del aliento [27]. Diferentes fenómenos como, emisión de contaminantes, pérdidas e interacciones irreversibles entre los distintos constituyentes de la muestra pueden modificar la composición de la misma y por tanto, producir una distorsión de los resultados del análisis [30].

Actualmente, las bolsas de Tedlar (PVF, polifloruro de vinilo) son las más conocidas y comúnmente aceptadas para recolectar muestras gaseosas en general, y aire exhalado en particular. Numerosos estudios han comparado entre el empleo de bolsas fabricadas con distintos polímeros entre ellas Tedlar, Kynar (PVDF, polifluoruro de vinilideno) y Flexfilm [30-32]. En ellos se demostró que las bolsas Tedlar, son las más adecuadas para el análisis de VOCs en niveles de ppb o ppt. Esto es debido a que las bolsas Kynar y Flexfilm emiten numerosos contaminantes, mayormente hidrocarburos, por lo que su uso estará limitado a casos en los que las concentraciones de VOCs fueran mayoritarios, del orden de partes por millón (ppm). En la *Figura 2*, se muestra una bolsa Tedlar de 1 L de capacidad, donde se puede ver en la parte derecha de la misma, que tiene un septum para poder introducir una jeringa muestreadora de gases o una fibra de microextracción en fase sólida (SPME) [30].

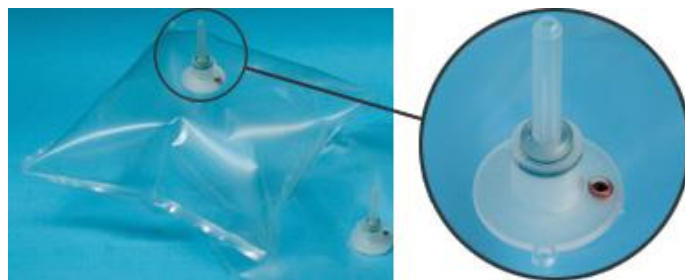


Figura 2: Bolsa de tipo Tedlar y ampliación de la boquilla de muestreo donde se puede observar el septum donde se puede introducir una jeringa muestreadora.

Para decidir que bolsa emplear se debe tener en cuenta los contaminantes que emiten estas bolsas y la estabilidad de los analitos en una vez almacenados en la bolsa. Se ha descrito que las bolsas de Flexfilm emiten un total de 27 compuestos, siendo los más dominantes los hidrocarburos y la acetona [30]. Una forma de reducir los compuestos emitidos por la bolsa es llenándola con nitrógeno varias veces consecutivas. De esta manera se minimiza la emisión de aldehídos, acetonas y ésteres, pero no de hidrocarburos [30]. También se ha descrito que las bolsas Kynar pueden llegar a liberar hasta 21 compuestos distintos, siendo los más predominantes compuestos aromáticos [30]. El proceso de pre-condicionamiento de la bolsa, llenándola con nitrógeno, es muy eficiente para la disminución de muchos interferentes aunque aumenta la concentración de especies de azufre (COS y CS₂), las cuales están presentes en todas las bolsas debido a las piezas de plástico de las válvulas de muestreo. Por otra parte las bolsas Tedlar, pueden llegar a emitir hasta 9 compuestos, siendo los mayoritarios N, N'-dimetilacetamida y fenol. [30,31].

La estabilidad de los analitos en las bolsas está fuertemente relacionada con el volumen de muestra. Independientemente de la naturaleza química del compuesto, su recuperación es significativamente mejor cuando la bolsa está llena al 80% de su capacidad total. La estabilidad de los hidrocarburos se ve significativamente resentida por la emisión de las bolsas, especialmente en las Kynar y Flexfilm. En cambio, como se ha comentado anteriormente, en las bolsas Tedlar este efecto es menos evidente [31].

La evaluación de la temperatura y la humedad relativa en las bolsas son muy importantes para la extracción de VOCs empleando una fibra de SPME. De esta manera, se ha descrito que cuanto menor sea la humedad mayor será la absorción de los analitos por el recubrimiento de la fibra [33].

1.4.2 Preconcentración de la muestra

La etapa de preconcentración es necesaria ya que la mayor parte de las sustancias que componen el aire espirado están en el rango de nmol L^{-1} o pmol L^{-1} [29]. Esta puede llevarse a cabo bien mediante un proceso de absorción en trampas adsorbentes, interacciones químicas o mediante criofoco [34]. Pero estas técnicas tradicionales presentan diversas desventajas como la utilización de dispositivos costosos, y tiempos de preparación de muestra muy largos [35].

La microextracción en fase sólida (SPME, *Solid phase microextraction*), fue inventada por Pawliszyn a finales de 1989. Se basa en la adsorción de compuestos orgánicos a un material (típicamente polidimetilsiloxano, PDMS) por exposición del mismo a la muestra. En el caso de compuestos volátiles esta exposición se puede realizar en fase gas y en el caso de compuestos no volátiles se puede realizar sumergiendo la fibra en la muestra líquida. Por tanto, esta técnica se puede aplicar tanto a analitos volátiles como a no volátiles, pero a lo largo de los últimos años el número de aplicaciones de muestreo en fase gaseosa ha superado con creces al de en fase líquida [36, 37].

El dispositivo de fibra de SPME consiste en un soporte en el que se fija una jeringa hueca en cuyo interior se encuentra la fibra. La función de la jeringa es traspasar un septum responsable de sellar la fase gaseosa donde se encuentra la muestra. Tras este paso, la fibra se expone a la muestra mediante un mecanismo de muelle y se vuelve a introducir en la jeringa una vez finalizado el periodo de muestreo. La *Figura 3* muestra el esquema de un dispositivo comercial de SPME comercializado por Supelco [37].

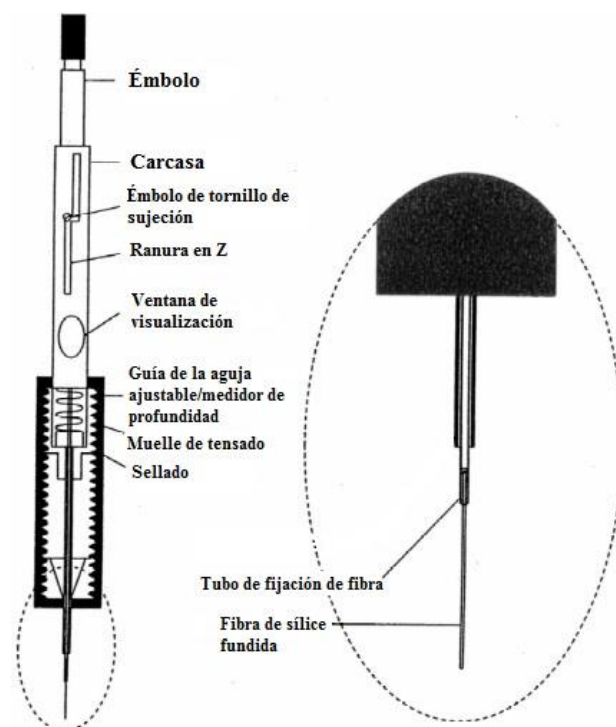


Figura 3: Esquema de un dispositivo comercial de fibra SPME.

Como se puede observar en la *Figura 3* el portafibras consiste en un émbolo con un resorte, una carcasa de acero inoxidable y un medidor de profundidad ajustable, y está diseñado para ser reutilizado cambiando la fibra empleada. La fibra de sílice fundida está recubierta con una película relativamente delgada de fases estacionarias poliméricas. Esta película actúa como una “esponja” concentrándose los analitos en su superficie [33].

Existe una gran variedad de fibras comercialmente disponibles (PDMS, CAR/PDMS, PA, PDMS/DVB, CW/DVB), en los cuales varía la composición de la fase estacionaria. La selección de una u otra depende de los analitos: la fibra de CW/DVB (Carbowax/Divinilbenceno) se aplica para el análisis de compuestos no-polares orgánicos, el recubrimiento de PA (Poliacrilato) es aplicable a compuestos orgánicos polares, la fibra de CAR/PDMS (Carboxeno/ Polidimetilsiloxano) se suele aplicar para la detección de VOCs e hidrocarburos y la de PDMS/DVB es adecuada para hidrocarburos y para analitos polares. Tras realizar una evaluación de las distintas posibilidades se decidió emplear a lo largo de este trabajo una fibra con un recubrimiento de PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/divinilbenceno) ya que se ha descrito en la bibliografía una mayor

eficiencia de absorción de compuestos volátiles en aire exhalado frente al resto de fibras. Esta evaluación se realizó comparando el número de compuestos detectados y el área de los picos obtenidos [33, 37, 38].

La SPME, se basa en que el analito es extraído directamente de la muestra y concentrado en el recubrimiento de la fibra. Es un proceso de partición de equilibrio del analito entre el recubrimiento de la fibra y la solución acuosa [39]. Para muestras líquidas y sólidas, hay generalmente tres fases involucradas en el proceso de microextracción: la fase gaseosa, la fase condensada (el líquido o el sólido) y la fase adsorbente de la fibra. La cantidad de analitos absorbida por el recubrimiento polimérico está relacionada con el equilibrio global de los analitos en el sistema entre la fase gaseosa y la adsorbente. Por tanto, en la fibra de SPME, la concentración de analito extraído de la muestra no depende sólo de la polaridad y grosor de la fase estacionaria, sino también del tiempo de extracción [37,39, 40].

La eficiencia, el tiempo, la portabilidad, el límite de detección alcanzado, así como el bajo coste son algunas de las mejoras que ofrece la SPME en comparación con la extracción en fase sólida tradicional. La SPME en combinación con la Cromatografía de Gases (GC, *Gas Chromatography*) es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de compuestos orgánicos volátiles en áreas como alimentos, bebidas, bioquímica clínica, biología de las plantas y control ambiental [34,39].

1.4.3 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

En 1971 Pauling ya empleaba la GC para la separación de compuestos volátiles [12]. Un análisis por GC requiere la introducción de la muestra en la cabeza de la columna cromatográfica. A continuación, mediante un flujo de gas inerte (fase móvil) la muestra se transporta e interacciona con la fase estacionaria de la columna. Dependiendo de la fase estacionaria que recubre la columna los compuestos se separan, de acuerdo con su interacción con ella. Sin embargo, en una separación por GC los distintos componentes de una mezcla se separan fundamentalmente en función de su punto de ebullición al ir incrementando gradualmente la T del horno donde se aloja la columna cromatográfica. La salida de la columna cromatográfica se acopla a un sistema de detección para la identificación y/o cuantificación de los compuestos analizados. La

espectrometría de masas (MS) es uno de los detectores más empleados en GC y se basa en la medida de la relación masa carga (m/z) de los iones generados en una fuente de ionización previa para la identificación y cuantificación de los analitos. El acoplamiento entre la cromatografía de gases a la espectrometría de masas se muestra en la *Figura 4* [29,41]

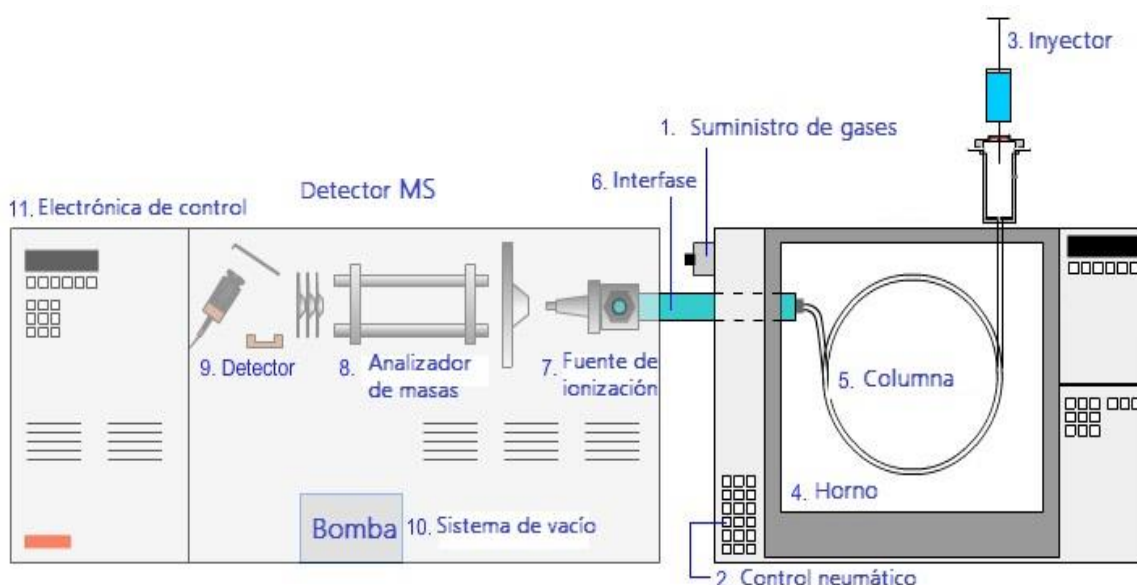
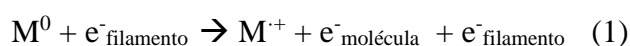


Figura 4: Acoplamiento de la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas con fuente de ionización electrónica.

1.4.3.1. GC-MS con fuente de ionización electrónica

Los equipos GC-MS empleados para realizar análisis cualitativos suelen operar con una fuente de ionización electrónica. La función básica de una fuente de ionización electrónica es la formación de iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa. Está formada por un filamento calentado de Re o W en forma de cable o bobina capaz de emitir electrones que son acelerados a potencial de 70 eV, aplicados entre un ánodo y el filamento. Las trayectorias de los electrones y las moléculas son perpendiculares de modo que los electrones al colisionar con las moléculas orgánicas las ionizan según la ecuación (1) causándoles la pérdida de electrones por repulsiones electrostáticas.



Como se muestra en la Figura 5, los iones positivos formados son atraídos por una placa de aceleración y repelidos por una placa de repulsión (repeller) mediante una diferencia de potencial aplicada entre ambas con objeto de introducirlas en el analizador de masas.

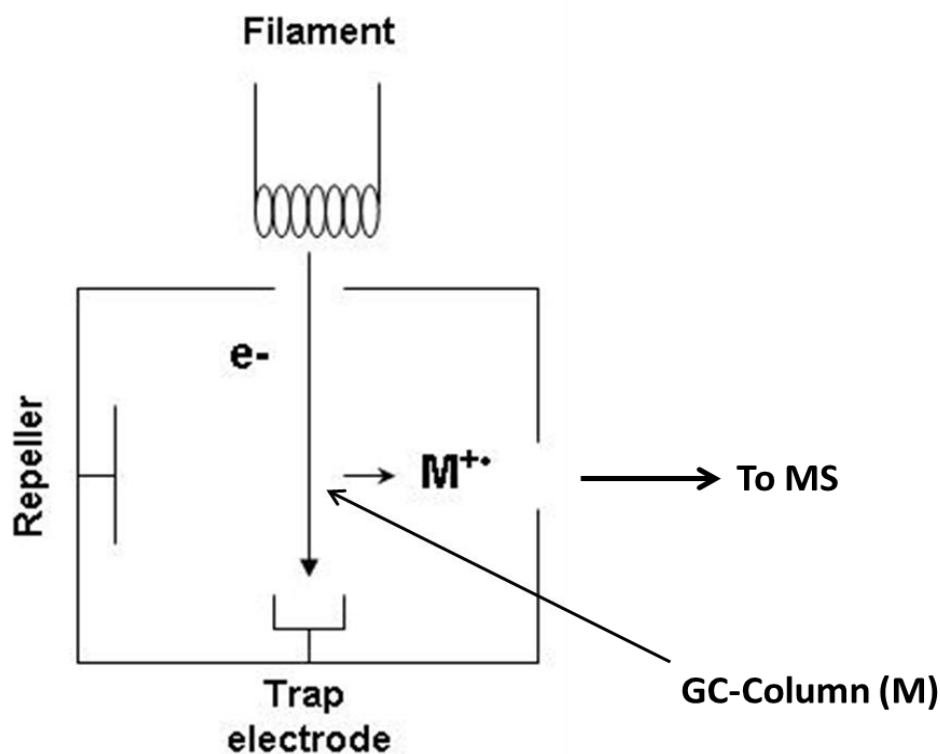


Figura 5: Esquema de una fuente de ionización electrónica.

El ion radical $M^{+\bullet}$ proporciona información analítica debido a que tiene el mismo peso molecular que la molécula original. Los iones moleculares al ser radicales y poseer una elevada energía son lábiles y pueden sufrir posteriores procesos de fragmentación que dependen, y son específicos, de cada molécula orgánica original. Los fragmentos moleculares formados proporcionan por tanto información estructural que confirme la existencia de la molécula. Además, la energía de ionización que se aplica a la fuente de ionización es de 70 eV, ya que con esa energía la fragmentación producida en las moléculas es reproducible independientemente del espectrómetro de masas utilizado. El empleo de un espectrómetro de masas con un cuadrupolo como analizador permite la identificación de los compuestos ya que existen bases de datos (que en muchos casos están instaladas en los propios equipos) que contienen una gran cantidad de espectros de

masas y realiza una comparación entre el espectro de masas teórico (la fragmentación teórica con 70 eV del analito) y el obtenido experimentalmente, permitiendo la identificación cuando ambos coinciden.

1.4.3.2. GC-C-IRMS

La cromatografía de gases también se puede acoplar a otro tipo de analizadores de masas como el analizador de sector magnético. El acoplamiento a este analizador constituye un sistema GC-C-IRMS (*Gas Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry following on-line Combustion*) y permite la medida directa y simultánea de las relaciones isotópicas específicas de los analitos con una gran precisión. Esto permite el estudio del fraccionamiento isotópico de C en compuestos orgánicos. Para ello, los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica se introducen en un horno de combustión para transformarlos en gases simples. En la *Figura 6* se muestra de forma esquemática los principales componentes de un sistema GC-IRMS: 1, inyector; 2, columna de separación cromatográfica; 3, FID; 4, uniones; 5, válvulas de backflush; 6, reactor de pirólisis; 7, inyector de gas de referencia; 8, fuente de ionización de impacto electrónico; 9, analizador de masas de sector magnético; 10, detectores de Faraday; 11, espectrómetro analógico.

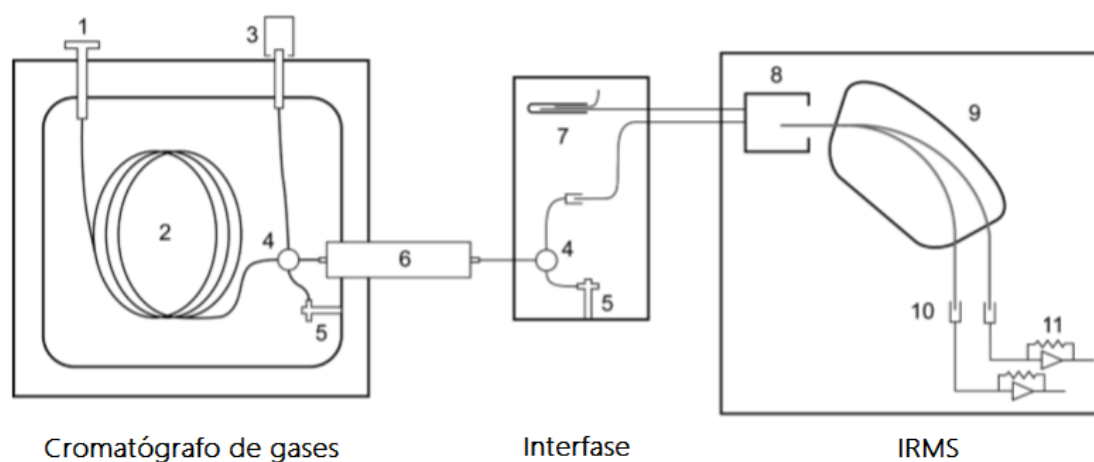


Figura 6: Esquema del equipo GC-C-IRMS.

Los componentes más destacables son el reactor de pirólisis u horno de combustión, donde los compuestos orgánicos de la muestra se convierten en gases simples (CO_2 ,

H₂O) mediante una combustión cuantitativa. Una vez convertidos los analitos en gases simples, éstos se introducen dentro de la fuente de ionización (Ionización electrónica), formándose iones que llegan al espectrómetro de masas. Todos los instrumentos IRMS, emplean un analizador de sector magnético y copas de Faraday como detectores para la medición analógica de las corrientes de iones. A lo largo de este Trabajo la medida de las relaciones isotópicas ¹³C/¹²C específicas de los analitos se realizó mediante la conversión de los mismos a CO₂. Para ello, se detectaron de forma simultánea las relaciones *m/z* 44 y 45.

2. Objetivo

El objetivo general del presente trabajo fin de máster es el desarrollo de una metodología para la detección de VOCs en aliento humano y la medida de su composición isotópica de Carbono mediante Cromatografía de Gases acoplada a distintos tipos de espectrómetros de masas, empleando bolsas Tedlar y la microextracción en fase sólida (SPME) como técnica de preconcentración.

Este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Identificación de los compuestos presentes en el aliento humano, mediante el empleo de dos columnas cromatográficas con distintas fases estacionarias, empleando GC-MS con fuente de ionización electrónica y analizador de masas de tipo cuadrupolo.
2. Estudio de la reproducibilidad de la detección y de la medida de la composición isotópica cuando se reutilizan las bolsas Tedlar empleadas para el muestreo del aire exhalado.
3. Medida de relaciones isotópicas relativas de carbono específicas de los analitos en el equipo GC-C-IRMS, mediante su comparación con la composición isotópica de un gas de referencia.
4. Estudio de la variación de las relaciones isotópicas de carbono específicas de los compuestos presentes en el aire exhalado de un individuo tras la ingestión de glucosa enriquecida en ^{13}C .

3. Experimental

3.1 Instrumentación

A lo largo del presente trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

- Espectrómetro de masas Agilent 5975B (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con una fuente de ionización electrónica que opera a energía de 70eV, y acoplado a un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890N. El cromatógrafo de gases empleado está equipado con un inyector split/splitless y con una columna capilar HP-PLOT Q de 30 m de longitud, 0.32mm de diámetro interno y 0.20 μm de espesor de fase estacionaria (DVB, Poliestireno-divinilbenceno). El cromatógrafo se acopla a la fuente de ionización mediante una línea de transferencia por la que se hace pasar el final de la columna capilar, justo hasta la entrada de la fuente. La línea de transferencia se puede calentar hasta 350°C para evitar la condensación de los analitos. Para la calibración del espectrómetro de masas se emplea perfluorotributilamina (PFTBA), que permite la calibración del equipo en un amplio rango de masas. Este compuesto genera varios iones en la fuente aunque el equipo utiliza los correspondientes a las m/z 69, 218 y 502 para realizar la calibración del equipo. Mediante un procedimiento automático de ajuste (“autotune”), se optimizan los parámetros relativos a la calibración de masas, extracción, enfoque, aceleración y detección de iones, para que se obtenga la mayor sensibilidad y una adecuada resolución de masas.
- Espectrómetro de masas Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) equipado con una fuente de ionización electrónica que opera a una energía de 70eV, y un analizador de triple cuadrupolo y acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent 7890. El cromatógrafo de gases está equipado con un inyector split/splitless y con una columna capilar DB5-MS de 30 m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de fase estacionaria (5% fenil 95% dimetil arilen siloxano). El acoplamiento entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas, es el mismo que el descrito anteriormente (Agilent 6890N acoplado a Agilent 5975B). Para la calibración del espectrómetro de masas se emplea también perfluorotributilamina (PFTBA).

- Espectrómetro de masas IRMS (*Isotope ratio mass spectrometry*) para la medida de relaciones isotópicas específicas de un compuesto modelo Thermo Scientific GC-IRMS (Thermo, Bremen, Alemania), equipado con una fuente de ionización electrónica que opera a una energía de 124eV, y un cromatógrafo de gases modelo Trace GC Ultra chromatograph. El cromatógrafo de gases está equipado con un inyector split/splitless y con una columna capilar DB5-MS de 30 m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de fase estacionaria (5% fenil 95% dimetil arilen siloxano). Entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas, el equipo tiene un horno de combustión de Ni / CuO/ Pt, que alcanza los 1000°C, para convertir los analitos en gases simples (CO_2 , H_2 , N_2 y SO_2) antes de su introducción en la fuente de ionización. Como analizador de masas el equipo consta de un sector magnético. La medida de las relaciones isotópicas de C se realiza mediante dos copas de Faraday que monitorizan las relaciones m/z 44 y 45 simultáneamente correspondientes a los isotopólogos $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ y $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ del CO_2 , respectivamente.

3.2 Reactivos

- Patrón de D-glucosa enriquecida en ^{13}C (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri Estados Unidos) enriquecida al 99% en ^{13}C . Para su consumo se diluyeron 100 mg en agua mineral embotellada.
- Material de referencia GC-IRMS que contiene n-C₁₁ (-26,11‰ vs VPDB), n-C₁₅(-30,22‰ vs VPDB) y n- C₂₀ (-33,06‰ vs VPDB) en una concentración 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en ciclohexano para cada uno de los tres componentes que forman la mezcla comercialmente denominada *Chiron* (Trondheim, Noruega).

3.3 Materiales

- Bolsas Tedlar (PVF, polifloruro de vinilo) de 1L, con válvula de bloqueo (Sigma-Aldrich).
- Fibra de SPME de 65 μm de PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/divinilbenceno) para inyección manual (Supelco).
- Liner de 0.75mm de diámetro interno para SPME (Sigma- Aldrich).

- Conector de acero inoxidable 0.25mm (Swagelok, Solon, Ohio, Estados Unidos).

3.4 Procedimientos

3.4.1 Toma de muestra y preconcentración

Las bolsas Tedlar se rellenan de una única insuflación y aproximadamente al 80 % de su capacidad, es decir la bolsa llena pero sin que su superficie este tensa. Tras el llenado de la bolsa se gira la válvula de seguridad de polipropileno a la posición de “bloqueo” para evitar fugas y se introduce por el septum de silicona de la válvula la fibra de PDMS/DVB, para realizar la microextacción en fase sólida. La aguja se debe introducir con una ligera inclinación para evitar romper la fibra. Se deja la fibra de SPME durante 2 horas a temperatura ambiente para la preconcentración de los analitos sobre la misma tal y como se muestra en la *Figura 7*. Trascurridas las 2 horas de preconcentración, la fibra se introduce en el inyector del cromatógrafo de gases inmediatamente después del muestreo.

Las muestras de aire exhalado analizadas a lo largo de este trabajo se tomaron del mismo voluntario: un varón de 56 años, 90 kg y fumador. Las bolsas Tedlar se llenaron todas las veces en las mismas condiciones: por la mañana antes de haber realizado el almuerzo y sin haber fumado ni bebido en un periodo de tiempo menor a 30 minutos. Para la realización de las medidas de aire exhalado siempre se llevó a cabo en cada sesión de medida un blanco de bolsa. Para ello, se rellenó con nitrógeno de 99.999% de pureza una bolsa Tedlar y se realizó la SPME de manera análoga a las muestras para poder identificar los compuestos que proceden exclusivamente de la bolsa.

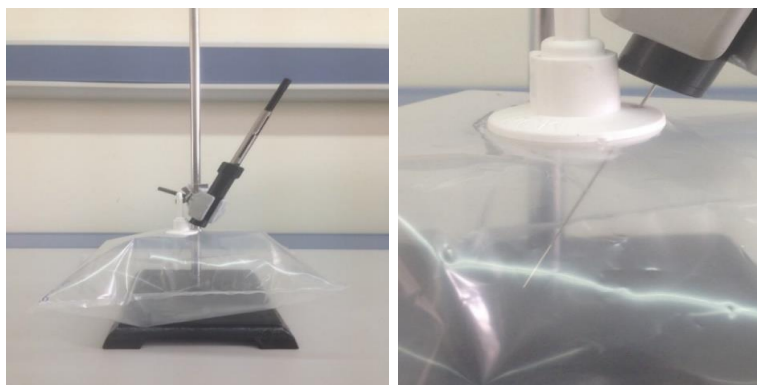


Figura 7: Montaje experimental para realizar la preconcentración de los analitos utilizando una bolsa Tedlar y SPME.

3.4.2 Identificación de los compuestos presentes en el aire exhalado humano

Para llevar a cabo la separación cromatográfica de los compuestos presentes en el aliento se emplearon dos columnas capilares con fases estacionarias distintas: una columna HP-PLOT Q instalada en el equipo GC-MS y una columna DB-5MS, instalada en el equipo GC-MS/MS.

La identificación de los analitos con la columna HP-PLOT Q se llevó a cabo monitorizando las muestras en modo barrido o SCAN, utilizando las condiciones experimentales que se recogen en la *Tabla 1*.

Tabla 1: Condiciones experimentales empleadas para la identificación de los analitos utilizando la columna HP-PLOTQ.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Columna	HP-PLOT Q (30 m x 32 mm x 0.20µm)
Inyección	Manual
Modo de inyección	Splitless, tiempo de purga 1 minuto
Flujo de gas portador	Helio (4 mL/min)
Temperatura del inyector	250 °C
Energía de ionización	70 ev
T ^a línea de transferencia	280 °C
T ^a fuente de ionización	230 °C
T ^a cuadrupolo	150 °C
Programa de temperatura del horno	60 °C(1 min), 10°C/min hasta 250°C (15 min)
CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS	
Solvent delay	0 min
m/z medidas	40-500 (modo SCAN)
Dwell time	100 ms

La identificación de los analitos con la columna DB5-MS utilizando el equipo GC-MS/MS en modo SCAN, se emplearon las condiciones experimentales que se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2: Condiciones experimentales empleadas para la identificación de los analitos utilizando la columna DB5-MS.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Columna	DB5-MS (30 m x 25 mm x 0.25 μ m)
Inyección	Manual
Modo de inyección	Splitless, tiempo de purga 1 minuto
Flujo de gas portador	Helio (1 mL/min)
Temperatura del inyector	200 °C
Energía de ionización	70 Ev
Tª línea de transferencia	280 °C
Tª fuente de ionización	230 °C
Tª cuadrupolo	150 °C
Programa de temperatura del horno	35 °C(1 min), 2°C/min hasta 300°C (3 min)
CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS	
Solvent delay	0 min
m/z medidas	40-500 (modo SCAN)
Dwell time	100 ms

Cabe resaltar que a lo largo de este trabajo también se realizaron análisis del aire exhalado, empleando las condiciones que se muestran en la *Tabla 2* en el equipo GC-MS/MS pero utilizando dos columnas DB5-MS conectadas en serie mediante un conector de acero Swagelok, consiguiendo de esta manera una columna de 60 m de 5% fenil 95% dimetil arilen siloxano como fase estacionaria.

3.4.3 Estudio de la reproducibilidad y reutilización de las bolsas

Para el estudio de la reproducibilidad de los analitos en las muestras y la evaluación de la reutilización de una misma bolsa para varias muestras, se muestreó el mismo aire exhalado en tres bolsas Tedlar en un mismo día en las mismas condiciones llenando una bolsa tras otra cumpliendo las directrices que se detallaron en el apartado “3.4.1 Toma de muestra y preconcentración”. El aire exhalado de estas bolsas se analizó empleando las condiciones experimentales de la *Tabla 1* utilizando el equipo GC-MS con la columna HP-PLOT Q. Además, en días consecutivos, se reutilizaron las tres bolsas llenándose en las mismas condiciones que cuando se llenaron por primera vez y se analizaron con el mismo método.

3.4.4 Estudio de los valores $\delta^{13}\text{C}$ (relaciones isotópicas relativas) de los compuestos presentes en el aire exhalado

Para llevar a cabo la medida de las relaciones isotópicas relativas se empleó un equipo GC-C-IRMS. Tras realizar el proceso de muestreo y preconcentración, de la misma forma que en los anteriores experimentos, se inyectó la fibra en el inyector split/splitless que se encontraba a 200°C. Se empleó Helio con un flujo de 1 mL min y una energía de 124eV en la fuente de ionización. Las condiciones cromatográficas en las cuales se llevó a cabo la separación fueron las mismas que las mostradas en la *Tabla 2*. Las relaciones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ para cada compuesto se calcularon mediante la integración de las áreas de pico correspondientes a las relaciones m/z 44 y 45.

El estudio de las variaciones isotópicas de los elementos en la naturaleza requiere la relativización de las relaciones isotópicas medidas experimentalmente a un patrón de referencia. Dicha relativización se realiza utilizando la notación delta, que proporciona información de la diferencia relativa entre las relaciones isotópicas de un elemento medidas en una muestra y un patrón de referencia (patrón “delta cero”). Las variaciones naturales son típicamente del orden de décimas de tanto por ciento y se suelen expresar en tanto por mil. Esto significa que los cambios en las relaciones isotópicas naturales ocurren en la tercera o cuarta cifra significativa.

En la notación delta (δ), se expresa en tanto por mil la relación de interés medida en la muestra (R_{muestra}) con respecto a una relación isotópica de referencia reconocida internacionalmente (R_{ref}), tal y como se muestra en la siguiente ecuación;

$$\delta_{ref} = \left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{ref}}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (2)$$

Las variaciones naturales en la composición isotópica del carbono en un compuesto se basan en la medida de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ específica de dicho compuesto. El patrón delta cero utilizado en las medidas de relaciones isotópicas de C es el carbono presente en el carbonato de calcio de un fósil marino denominado *Benemitella Americana* perteneciente a la formación cretácica Pee Dee en Carolina del Sur (Estados Unidos). Este patrón se denomina VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite*) ya que fue

comercializado por la IAEA Agencia Internacional de Energía Atómica de Viena (Austria). Este material se utilizó durante muchos años para normalizar las relaciones isotópicas de C, ya que se toma como el valor cero de la escala de δ , de acuerdo con la siguiente ecuación;

$$\delta^{13}C_{VPDB} = \left(\frac{(^{13}C/^{12}C)_{muestra}}{(^{13}C/^{12}C)_{VPDB}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (3)$$

Por tanto, cuando la relación $^{13}C/^{12}C$ en la muestra es mayor que la de referencia, tendremos valores positivos de delta y en caso contrario, valores de delta negativos. Al haberse agotado el VPDB actualmente se emplea como materiales de referencia patrones secundarios que han sido certificados previamente respecto al VPDB, de esta manera se obtiene:

$$\delta^{13}C_{VPDB\ ref} = \left(\frac{(^{13}C/^{12}C)_{ref}}{(^{13}C/^{12}C)_{VPDB}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (4)$$

Tras despejar la relación isotópica en $^{13}C/^{12}C$ en el material de referencia VPDB, y sustituyendo este valor en la ecuación (3), se obtiene la ecuación utilizada en el presente Trabajo Fin de Master para el cálculo de variaciones naturales en la composición isotópica de carbono empleando la notación delta:

$$\delta^{13}C_{VPDB} = \left(\left(\frac{(^{13}C/^{12}C)_{muestra}}{(^{13}C/^{12}C)_{ref}} \right) \cdot \left(\frac{\delta^{13}C_{VPDB\ ref}}{1000} + 1 \right) - 1 \right) \cdot 1000 \quad (5)$$

Existen numerosos materiales certificados en delta y en el presente trabajo se empleó una mezcla de tres alcanos ($C_{11}H_{24}$, $C_{15}H_{32}$, $C_{20}H_{42}$) denominada Chiron cuyos valores en delta están certificados frente al patrón VPDB.

3.4.5 Estudio de las variaciones en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en los compuestos de aire exhalado tras la ingesta de glucosa marcada en ^{13}C

En primer lugar, el voluntario, que se encontraba en ayunas, ingirió glucosa marcada en ^{13}C en todos sus átomos de carbono. Para ello el voluntario se diluyeron 100 mg de la glucosa marcada en 10 mL de agua mineral. Se tomaron cinco muestras del aire exhalado: 1) antes de la ingesta 2) después de media hora tras el momento de la ingestión 3) después de una hora 4) después de dos horas y 5) después de tres horas. Estas muestras se analizaron como se describe en el apartado “3.4.4 Estudio de las relaciones isotópicas relativas de carbono de los compuestos de aire exhalado”.

4. *Resultados y discusión*

4.1 Identificación de los compuestos presentes en el aire exhalado humano

Para realizar la identificación de los compuestos presentes en el aire exhalado se emplearon a lo largo de este trabajo dos columnas cromatográficas con una fase estacionaria distintas: HP-PLOT Q y DB5-MS.

4.1.1 Empleo de la columna HP-PLOT Q

Las columnas PLOT (del inglés *Porous Layer Open Tubular*, tubular abierta de capa porosa) están diseñadas para la separación de solutos muy volátiles sin que sea necesario un enfriamiento criogénico o trabajar por debajo de la temperatura ambiente del horno. La fase estacionaria de la columna es físicamente distinta de los polisiloxanos, ya que consiste en partículas porosas pequeñas de poliestireno y divinilbenceno. Estas partículas se encuentran unidas a la pared interior del tubo capilar, tal y como se muestra en la *Figura 8*. Los solutos se separan no solo en función de su diferente adsorción sobre la fase estacionaria sino también en función de su tamaño y forma debido a la porosidad de las partículas.

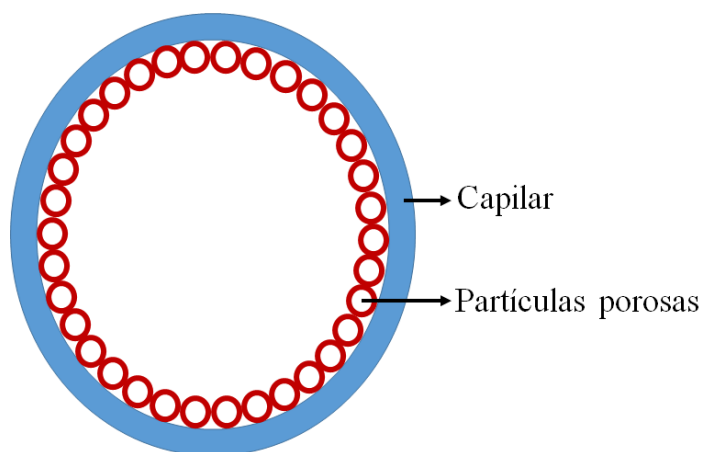


Figura 8: Esquema de una sección transversal de la columna HP-PLOTQ.

La columna utilizada se instaló en un equipo GC-MS, donde se empleó la biblioteca de espectros Wiley 275, para la identificación de los VOCs presentes en el aliento del voluntario. En primer lugar, se llevó a cabo una adquisición del espectro de masas en modo barrido en un rango de masas de 40 a 500 m/z, ya que desconocía su

composición. De esta manera se obtuvo un cromatograma TIC (*Total Ion Chromatogram*) que corresponde a la suma de intensidades de todo el rango de masas monitorizado. Con este barrido se pudo realizarla identificación de los compuestos que se muestran en la *Tabla 3* mediante la comparación de los espectros experimentales con los de la librería.

Tabla 3: Identificación de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario empleando la columna HP-PLOTQ.

Pico	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	1,235	CO ₂
2	9,954	Acetona
3	10,971	Isopreno
4	14,895	Ácido acético
5	15,941	Piridina
6	17,040	Tolueno
7	17,127	Ácido propanoico
8	23,970	Limoneno

Tras haber realizado la identificación se repitió el análisis del aire respirado, pero realizando una adquisición del espectro de masas en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*). De esta forma el espectrómetro de masas sólo transmite y detecta los compuestos ya identificados con una mejor relación señal/ruido. Para los compuestos que se muestran en la *Tabla 3* se seleccionaron las relaciones m/z correspondientes a los iones más abundantes. El modo SIM permite la detección más específica de los analitos ya que se aumenta la relación señal-ruido y permite detectar concentraciones menores que en modo SCAN. Además nos permite eliminar las señales de compuestos que proceden de la bolsa, como son la N, N'-dimetilacetamida o fenol (siendo los picos más intensos observados en el TIC). De esta forma se obtuvo el cromatograma que se muestra en la *Figura 9*.

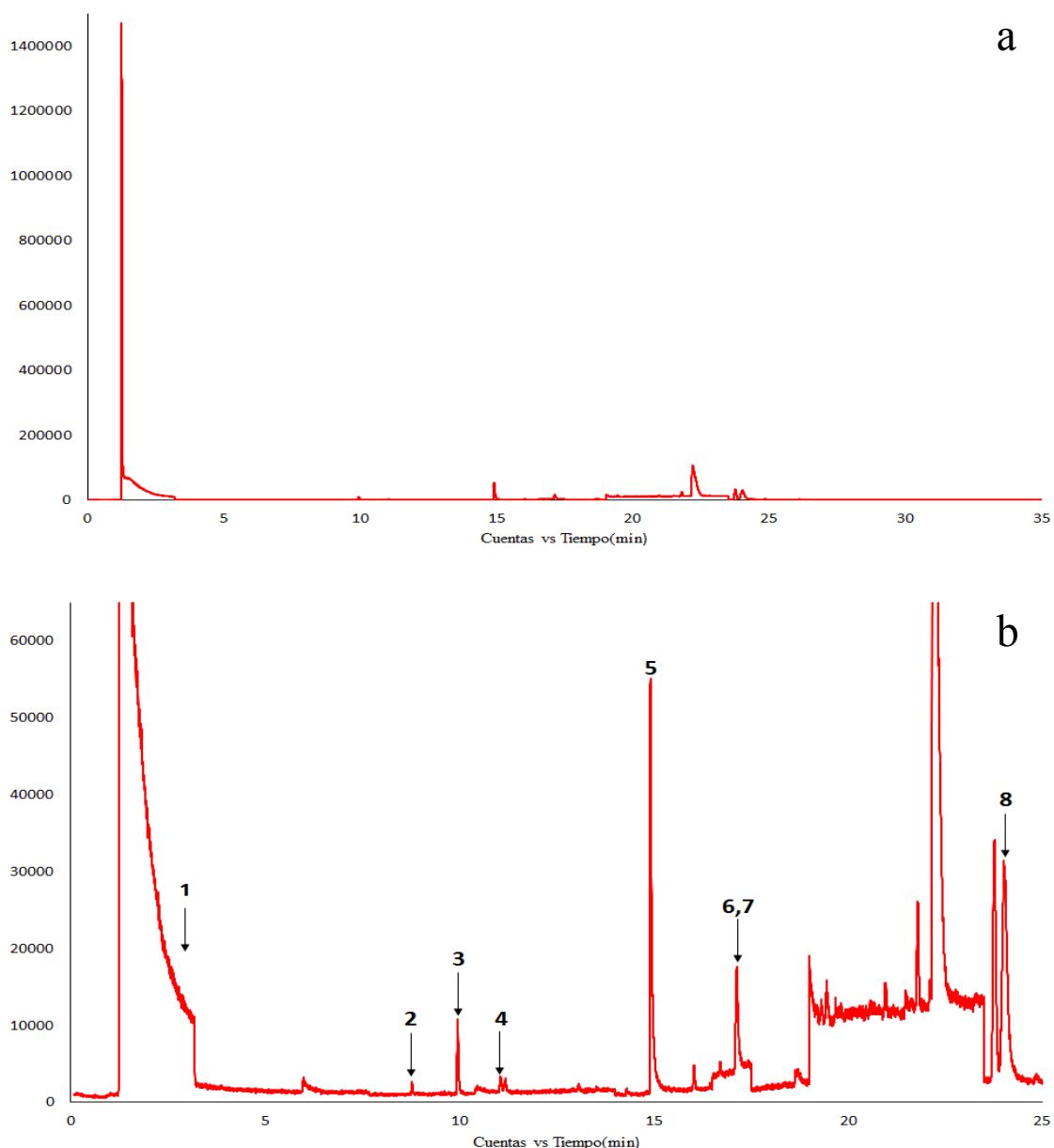


Figura 9: a) Cromatograma GC-MS obtenido en modo SIM con la columna HP-PLOTQ de una muestra de aire exhalado b) Ampliación del cromatograma anterior desde 0 a 25 minutos para la identificación de los VOCs minoritarios presentes en la muestra de aire exhalado.

La Figura 9b corresponde a una ampliación del cromatograma de la Figura 9a donde se identifican los compuestos de la Tabla 3. Aunque se pueden observar más picos de los identificados, la mayor parte de estos se descartaron ya que estaban presentes en el cromatograma obtenido tras analizar el blanco de la bolsa Tedlar. Otros picos, los menos intensos, no se encontraron en el blanco de bolsa pero no se pudieron identificar ya que, al medir en modo SIM, se desconoce su espectro de masas completo. En modo barrido o SCAN no se pudieron identificar ya que presentaban una intensidad muy

pequeña respecto al fondo espectral. Por otra parte, el pico que eluye con un tiempo de retención de 17 minutos (indicado en la *Figura 9b* con los números 6 y 7) corresponde a dos analitos con un tiempo de retención similar tal y como se muestra en la Tabla 3.

4.1.2 Empleo de la columna DB-5MS

La columna DB-5MS tiene una fase estacionaria del polímero fenil arileno equivalente a (5%-fenil)-metilpolisiloxano. Esta columna es adecuada para equipos GC-MS ya que proporciona un bajo sangrado lo que permite trabajar con una relación señal/ruido aceptable. En la *Figura 10* se muestra un esquema de la sección transversal de una columna DB-5MS. Las columnas de polisiloxano, en la que su fase estacionaria es un líquido, tiene un mecanismo de separación diferente a la llevaba a cabo por una columna PLOT. En este tipo de fases estacionarias la interacción principal con los solutos es la dispersión. La dispersión se puede resumir en el concepto de volatilidad. Consiste, por tanto, en que cuanto más volátil sea el soluto, más rápido se eluirá de la columna (y por tanto el tiempo de retención será menor).

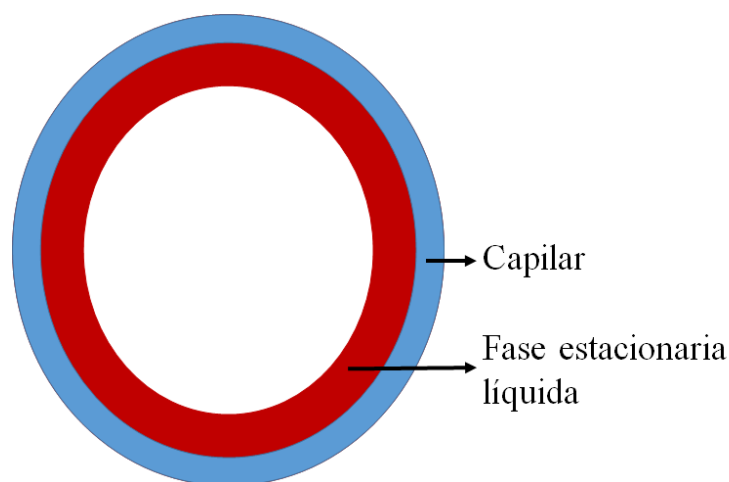


Figura 10: Esquema de una sección transversal de la columna DB-5MS.

Esta columna se instaló en un equipo GC-MS/MS de tipo triple cuadrupolo. Este equipo aporta mayor sensibilidad y especificidad en el análisis ya que permite realizar análisis por Espectrometría de Masas en tándem. Sin embargo, a lo largo de este Trabajo Fin de

Máster solamente se empleó en modo barrido o SCAN para llevar a cabo la identificación de los compuestos en el aire exhalado, de la misma manera que cuando se utilizó el GC-MS convencional con la columna HP-PLOTQ. Para ello, el equipo de triple cuadrupolo utiliza el primer analizador de masas MS1 para realizar el barrido mientras que la celda de colisión (hexapolo) y el segundo analizador de masas de cuadrupolo (MS2) se utilizan para enfocar los iones al detector. Para la indentificación de los compuestos, es este equipo se utilizaron simultáneamente dos librerías de espectros: la librería Wiley 275 y la librería NIST. Los compuestos que se identificaron se muestran en la *Tabla 4*.

Tabla 4: Identificación de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario empleando la columna DB-5MS.

Pico	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	2,236	CO ₂
2	3,810	1,3,5- hexatrieno
3	3,874	1,3-ciclohexadieno
4	4,145	Benceno
5	5,030	2,5-dimetilfurano
6	6,820	Tolueno
7	7,750	1,2-dietilciclobutano
8	10,963	Etilbenceno
9	20,704	2-pentadecen-4-ino
10	21,754	Limoneno
11	22,160	1-metoxi-1,4-ciclohexadieno
12	22,572	Indeno
13	26,031	(2-metil-1-propenil)benceno
14	29,891	3-metil-1H-indeno
15	30,066	1-metil-1H-indeno
16	32,389	Naftaleno
17	34,664	4,7-dimetilbenzofurano
18	34,796	2,6-dimetilundecano
19	37,202	1,2-dihidro-3-metilnaftaleno

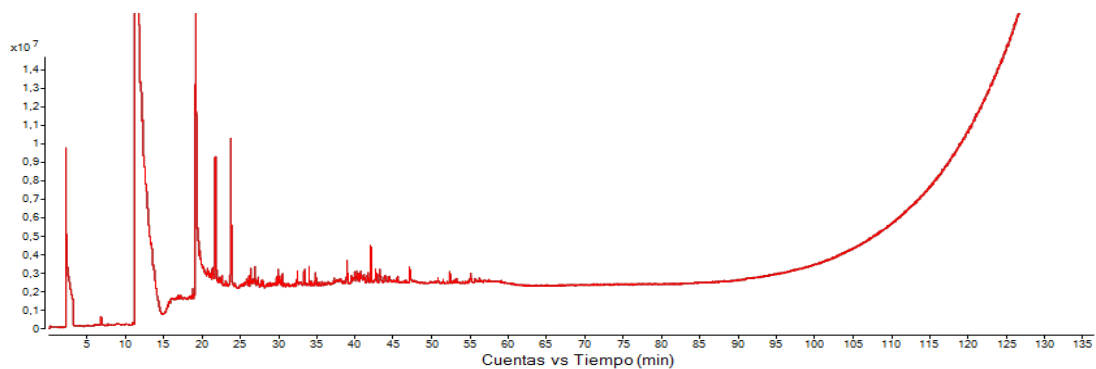


Figura 11: Cromatograma GC-MS obtenido en modo barrido o SCAN para una muestra de aire exhalado utilizando la columna DB-5MS.

En la *Figura 11* se muestra el cromatograma obtenido en modo SCAN con la columna DB-5MS. Debido a la gran cantidad de picos presentes en la muestra, este cromatograma se dividió en varias franjas de tiempo como muestra la *Figura 12* para observar con una mayor claridad los compuestos identificados en la *Tabla 4*.

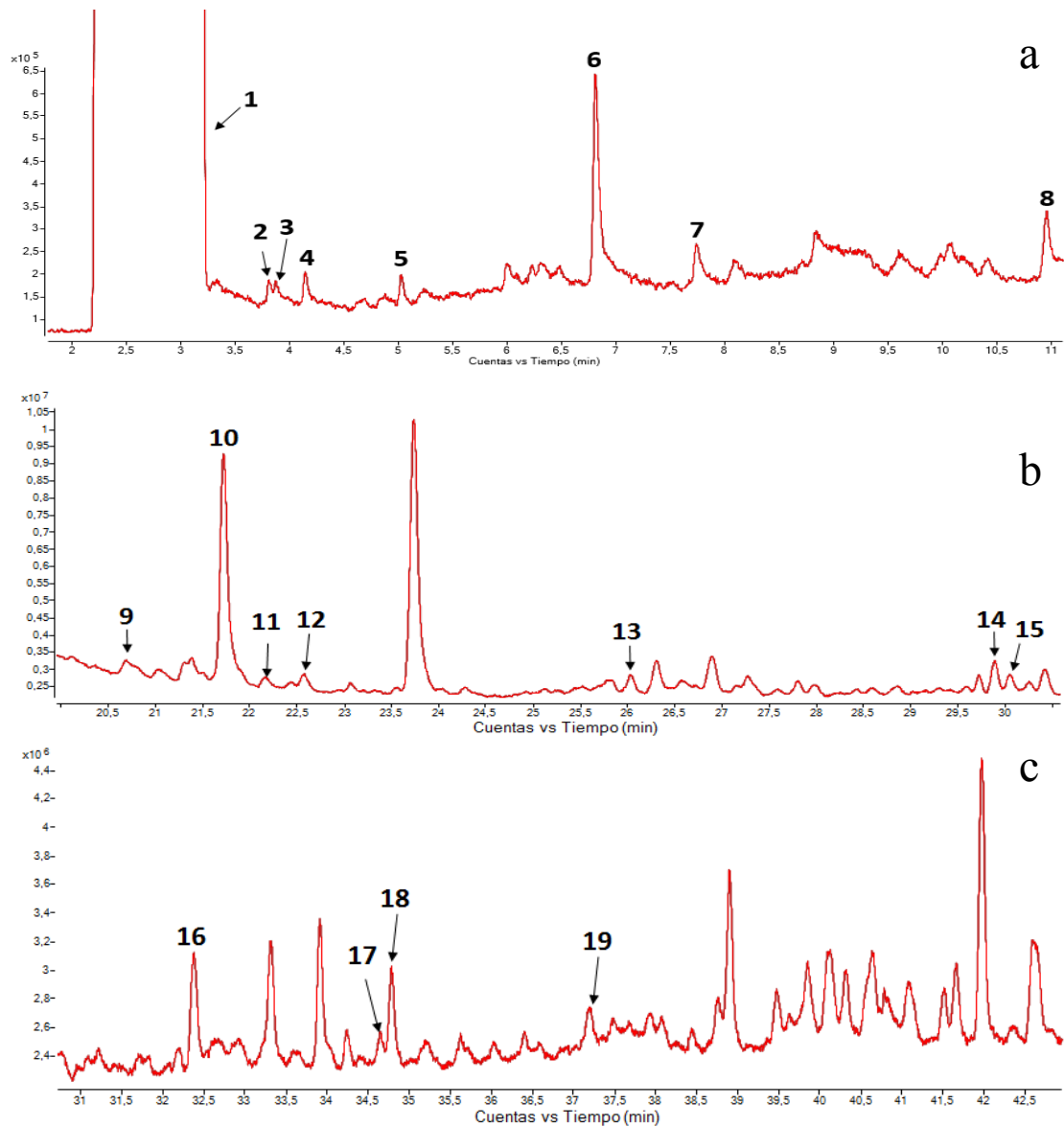


Figura 12: Ampliación del cromatograma GC-MS de la Figura 11 a) desde 2 a 11 minutos, b) desde 20 a 30,5 minutos y c) desde 31 a 43 minutos para la identificación visual de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario separados con la columna DB-5MS.

Como se puede observar en la *Figura 12* algunos de los VOCs no se resuelven tras la separación cromatográfica, como por ejemplo los picos 2 y 3. Además otros picos más anchos, que no se pudieron identificar a partir de su espectro de masas, parece que están compuestos por varios analitos. Debido a esto se intentó mejorar la resolución cromatográfica aumentando su longitud (L) ya que como se muestra en la ecuación (6) al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos (N) y por tanto la resolución.

$$N = L/H \quad (6)$$

Se decidió doblar la longitud de la columna cromatográfica empleando dos columnas DB-5MS iguales que se acoplaron entre sí con un conector de acero inoxidable de Swagelok. De esta forma se obtuvo el cromatograma de la *Figura 13* y el número de compuestos identificados aumentó de 19 a 39 como se muestra en la *Tabla 5*.

Tabla 5: Identificación de los VOCs presentes en el aire exhalado del voluntario empleando dos columnas DB-5MS de 30 m acopladas en serie.

Pico	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	6,533	Isopreno
2	7,323	2-metilpentano
3	7,580	3-metilpentano
4	7,914	Hexano
5	8,401	2-metil-2-etoxipropano
6	8,973	1,3 ciclohexadieno
7	9,661	Benceno
8	9,754	3-etil,2,4-dimetilpentano
9	10,088	3-metilhexano
10	10,576	2,2,4-trimetilpentano
		2,2,3,3-tetrametilbutano
		2,2-dimetilhexano
11	11,024	Heptano
12	11,288	2,5-dimetilfurano
13	12,260	metil-ciclohexano
14	14,391	Tolueno
15	15,748	1-octeno
16	17,655	2,4-dimetilheptano

17	19,588	2,6-dimetil-1-hepteno
18	20,428	Etilbenceno
19	20,874	Xileno
20	30,796	3,3,5-trimetil-1,5 heptadieno
21	30,929	Decano
22	31,465	2,6-dimetilnonano
		4,6-dimetildodecano
		2,3,6-trimetiloctano
23	31,806	2,6-dimetilnonano
		4,6-dimetildodecano
		2,3,6-trimetiloctano
24	32,444	7-metildeceno
25	32,882	1-metil,3-(1-metiletetil)-ciclohexano
26	33,277	Limoneno
27	35,130	4,6-dimetildodecano
		2,7,10-trimetildodecano
28	35,572	4,6-dimetildodecano
		2,7,10-trimetildodecano
29	36,747	2,4-dimetil-1-deceno
		2,7-dimetil-1-octanol
30	37,088	2,4-dimetil-1-deceno
		2,7-dimetil-1-octanol
31	38,555	Undecano
32	38,967	4,5-dimetilnonano
33	45,949	Dodecano
34	46,855	2,5-dimetilundecano
		2,6-dimetilundecano
35	53,543	2-butil-1-octanol
36	55,543	3,6-dimetildeceno
		2,10-dimetilundecano
37	56,230	4-metildodecano
		4,8-dimetildodecano
38	59,555	Tetradecano
39	68,978	2,6,10,15-tetrametilheptadecano
		2,7,10-trimetildodecano
		2,6,11-trimetildodecano

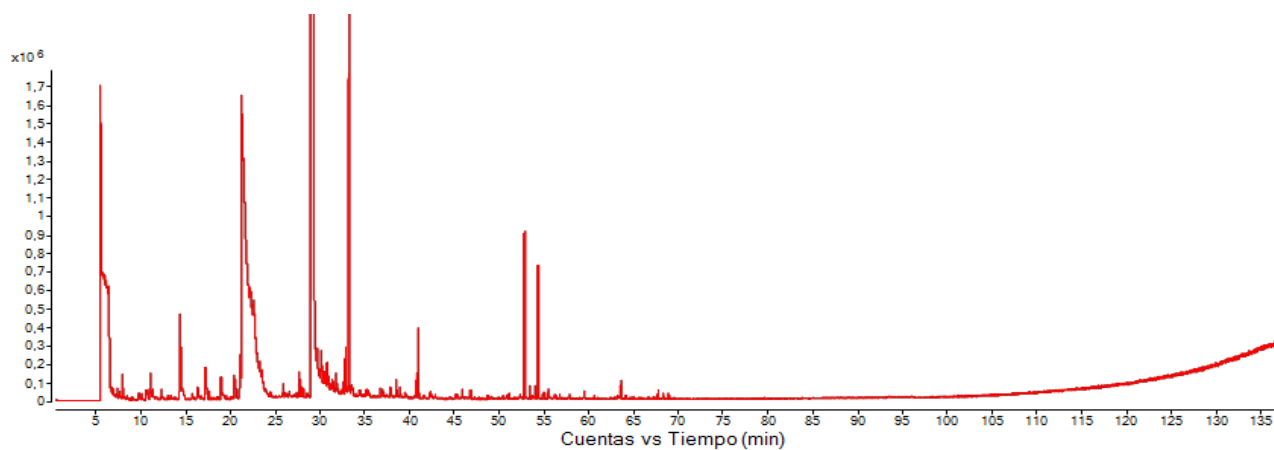


Figura 13: Cromatograma GC-MS obtenido en modo barrido o SCAN para una muestra de aire exhalado utilizando dos columnas DB-5MS de 30 m acopladas en serie.

Al igual que lo sucedido con el cromatograma obtenido con 30 m de columna, en la Figura 13 no se puede observar con claridad la gran cantidad de picos detectados. Por ello la Figura 14 muestra distintas franjas de tiempo del cromatograma anterior donde se indican cuáles son los picos que se han identificado en la Tabla 5.

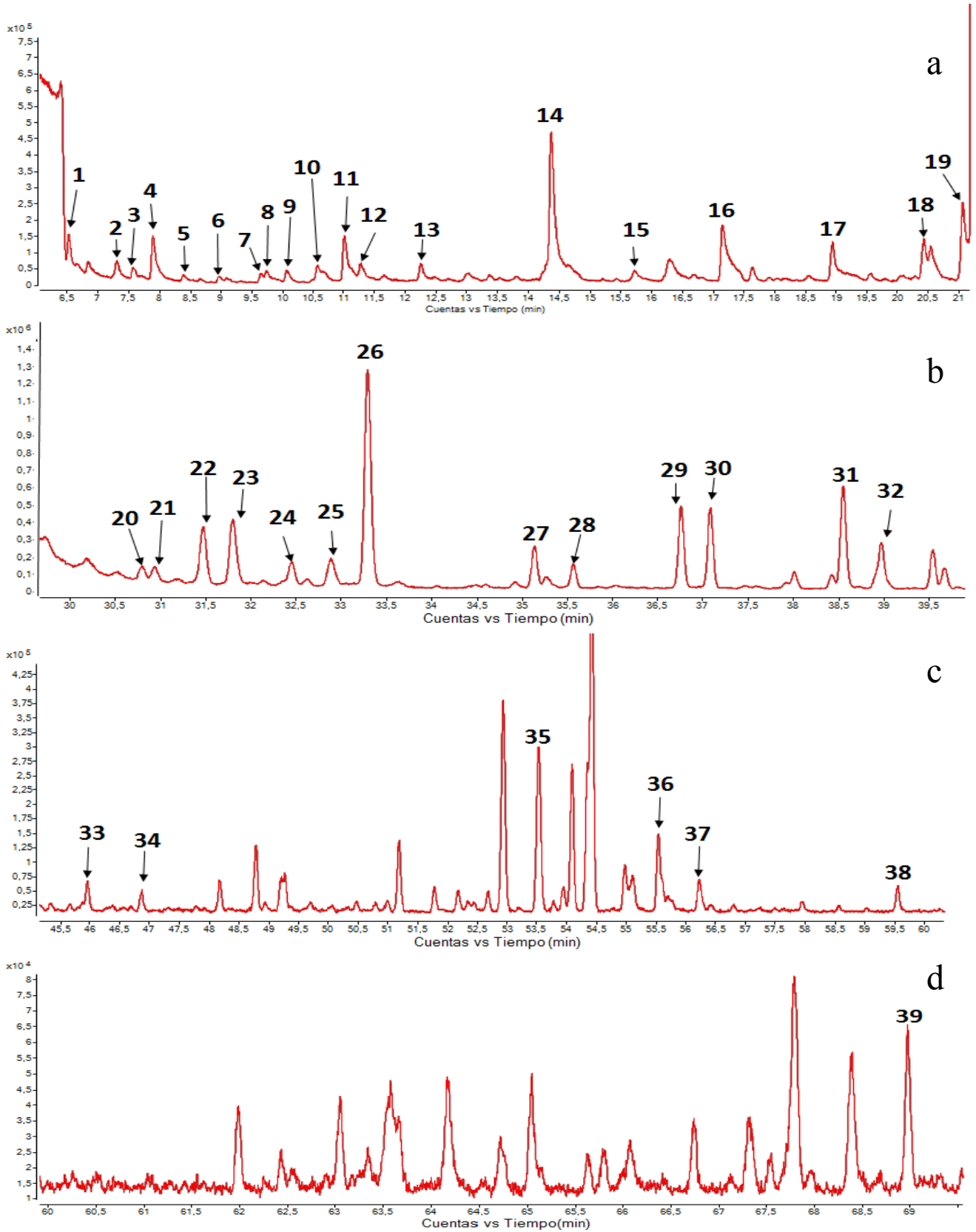


Figura 14: Ampliación del cromatograma GC-MS de la Figura 13 a) desde 6 a 21 minutos, b) desde 30 a 40 minutos, c) desde 45 a 60,5 minutos y d) desde 60 a 70 minutos para la identificación visual de los VOCs separados con dos columnas de 30 m DB-5MS acopladas en serie.

El acoplamiento en serie de dos columnas cromatográficas de 30 metros permitió la indentificación de 39 compuestos, casi el doble de los obtenidos con una sola columna de 30 m debido a la mejor resolución cromatográfica obtenida. Sin embargo, no se pudieron resolver los isómeros de algunos VOCs debido a que su polaridad y volatilidad es muy similar. Por esa misma razón, a pesar de haberse encontrado 63 picos distintos en la muestra que en el blanco las librerías de espectros no pudieron reconocerlos a todos ya que sus espectros de masas son muy similares entre sí.

4.2 Estudio de la reproducibilidad y reutilización de las bolsas Tedlar

El empleo de las bolsas Tedlar para realizar el muestreo del aire exhalado ofrece diversas ventajas como su bajo precio, su alta durabilidad y por liberar un bajo número de compuestos interferentes. En los experimentos realizados a lo largo de este Trabajo Fin de Máster se observó que las bolsas Tedlar emitían más de 20 compuestos, siendo la N, N'-acetamida y el fenol los más abundantes. Los picos cromatográficos correspondientes a ambos compuestos presentan grandes colas y enmascaran significativamente la señal de alguno de los analitos. Además, la distribuidora de las bolsas indica en sus instrucciones de empleo que las bolsas Tedlar no son reutilizables, a diferencia de diversos estudios que demuestran lo contrario [30,31]. Por todo ello, se diseñaron varios experimentos con el objetivo de estudiar la variabilidad de resultados obtenidos con distintas bolsas y la posibilidad de reutilización de las mismas.

En primer lugar se rellenaron tres bolsas Tedlar por el mismo individuo y se analizaron empleando la misma secuencia de análisis basada en medir previamente a las muestras un blanco de la fibra SPME y un blanco de bolsa Tedlar rellena con nitrógeno con la columna cromatográfica HP-PLOTQ. Se observó la presencia de seis analitos que se repetían en las tres ocasiones (*Figura 15*), aunque el fondo espectral de la bolsa 1 entre 20 y 22 minutos no fue el mismo que para las otras dos bolsas. Por otra parte, cuando se reutilizaron las bolsas se obtuvieron unos resultados satisfactorios ya que se encontraron los mismos analitos y con la misma sensibilidad, en comparación con los resultados obtenidos en el primer uso tal y como se muestra en la *Figura 16*.

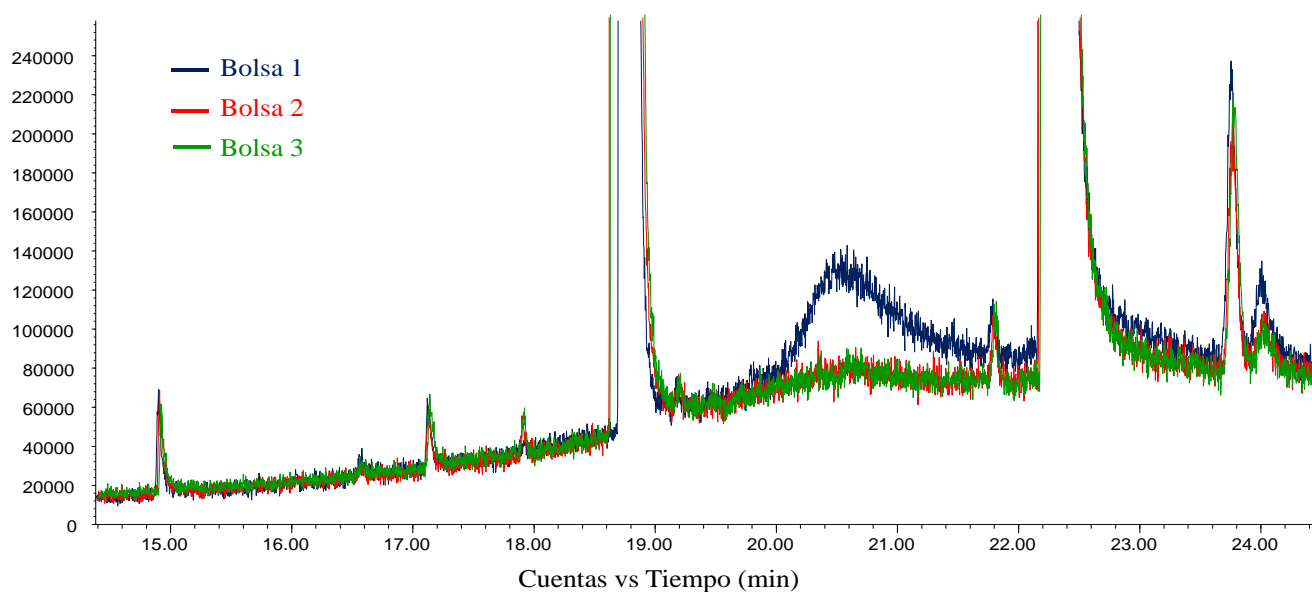


Figura 15: Superposición de cromatogramas GC-MS obtenidos en modo barrido o SCAN para las tres bolsas empleadas para el estudio de la reproducibilidad de las bolsas Tedlar, estando las tres rellenas del aire exhalado del mismo voluntario.

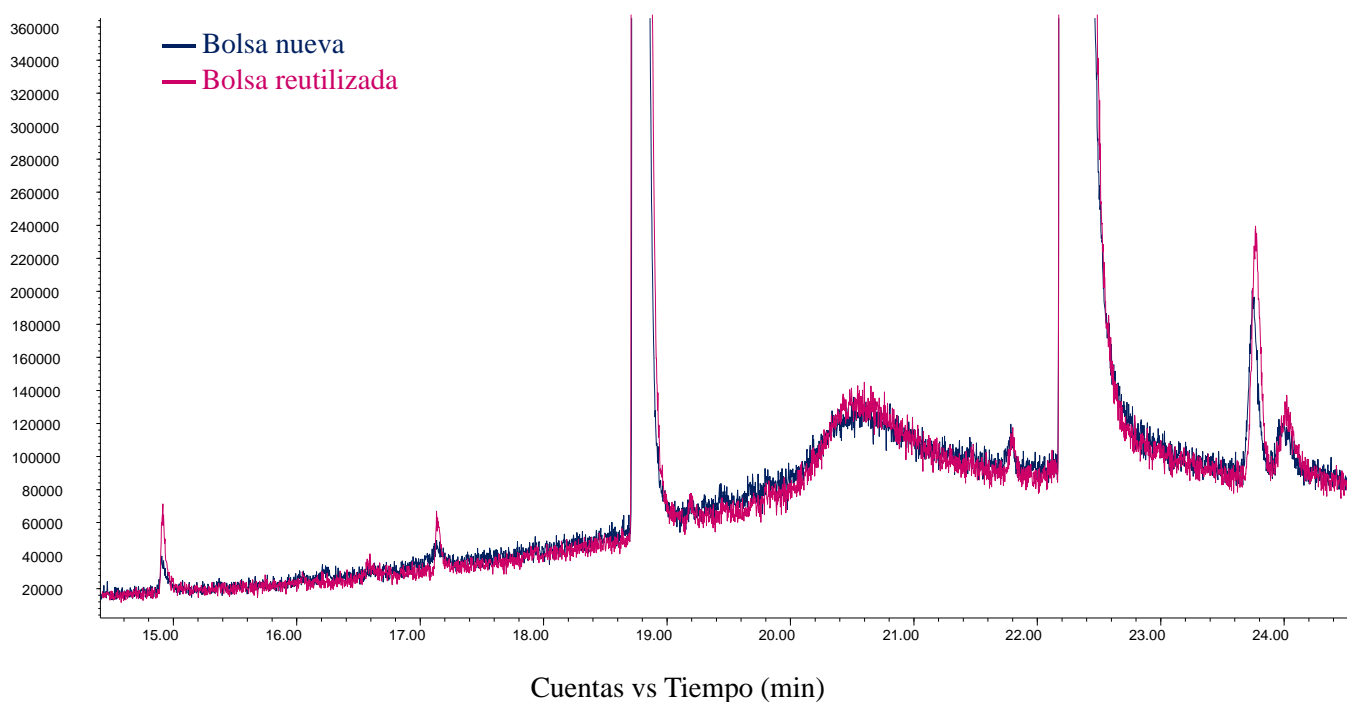


Figura 16: Superposición de cromatogramas GC-MS obtenidos en modo barrido o SCAN para la misma bolsa (bolsa 1) en su primer uso y tras su reutilización, estando en ambas ocasiones rellena del aire exhalado del mismo voluntario.

Sin embargo, un inconveniente que presentan estas bolsas reside en el agujero que forma la fibra de SPME al perforar el septum de la bolsa, ya que es suficientemente grande como para producir una fuga al reutilizar la bolsa. Por esta razón, el almacenamiento de muestras con bolsas reutilizadas durante periodos largos de tiempo no es recomendable.

4.3 Estudio de las relaciones isotópicas relativas de carbono en los compuestos de aire exhalado

Para llevar a cabo la medida de relaciones isotópicas de carbono específicas del compuesto en los distintos VOCs del aire exhalado se empleó un equipo GC-C-IRMS. Tras realizar un primer análisis del aire exhalado en este equipo utilizando una columna DB-5MS de 30 m, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la *Figura 17*.

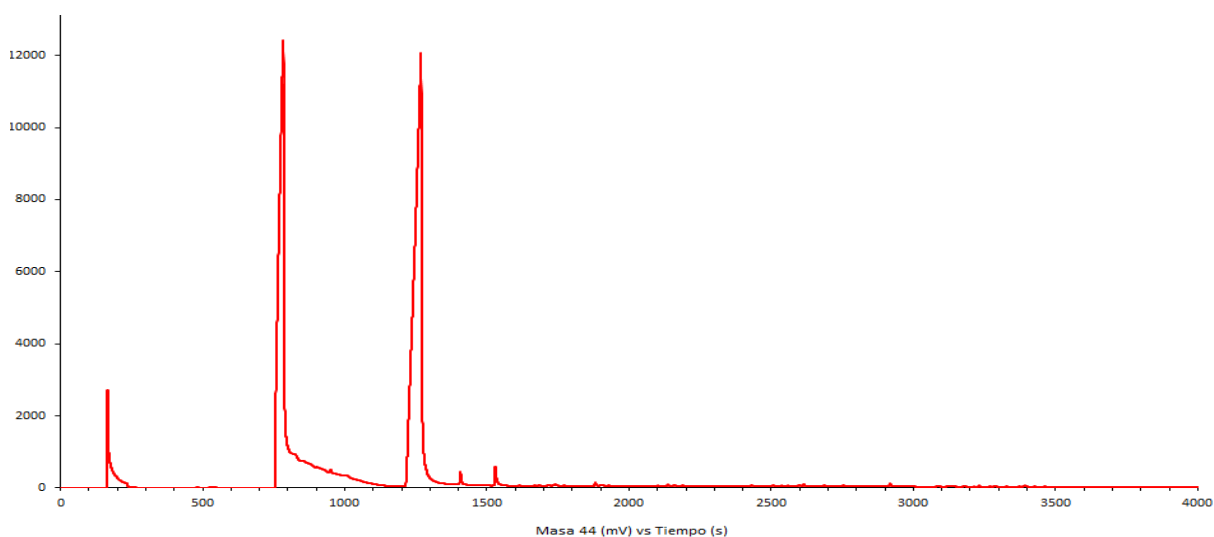


Figura 17: Cromatograma GC-C-IRMS obtenido en una muestra de aire exhalado utilizando la columna de DB-5MS de 30 m para una muestra de aire exhalado.

En este cromatograma se pueden apreciar dos picos muy intensos correspondientes a la N, N'-acetamida y el fenol, y en menor medida se observa al principio del cromatograma una señal del CO₂. Al estar el cromatograma en una escala tan grande impide que se puedan apreciar otros picos menos intensos. Mediante la comparación del análisis de un blanco de bolsa con el análisis de la muestra de aire exhalado se muestran en la *Figura 17* los compuestos que pertenecen al aire exhalado. Estos VOCs se resaltan en la figura con una flecha.

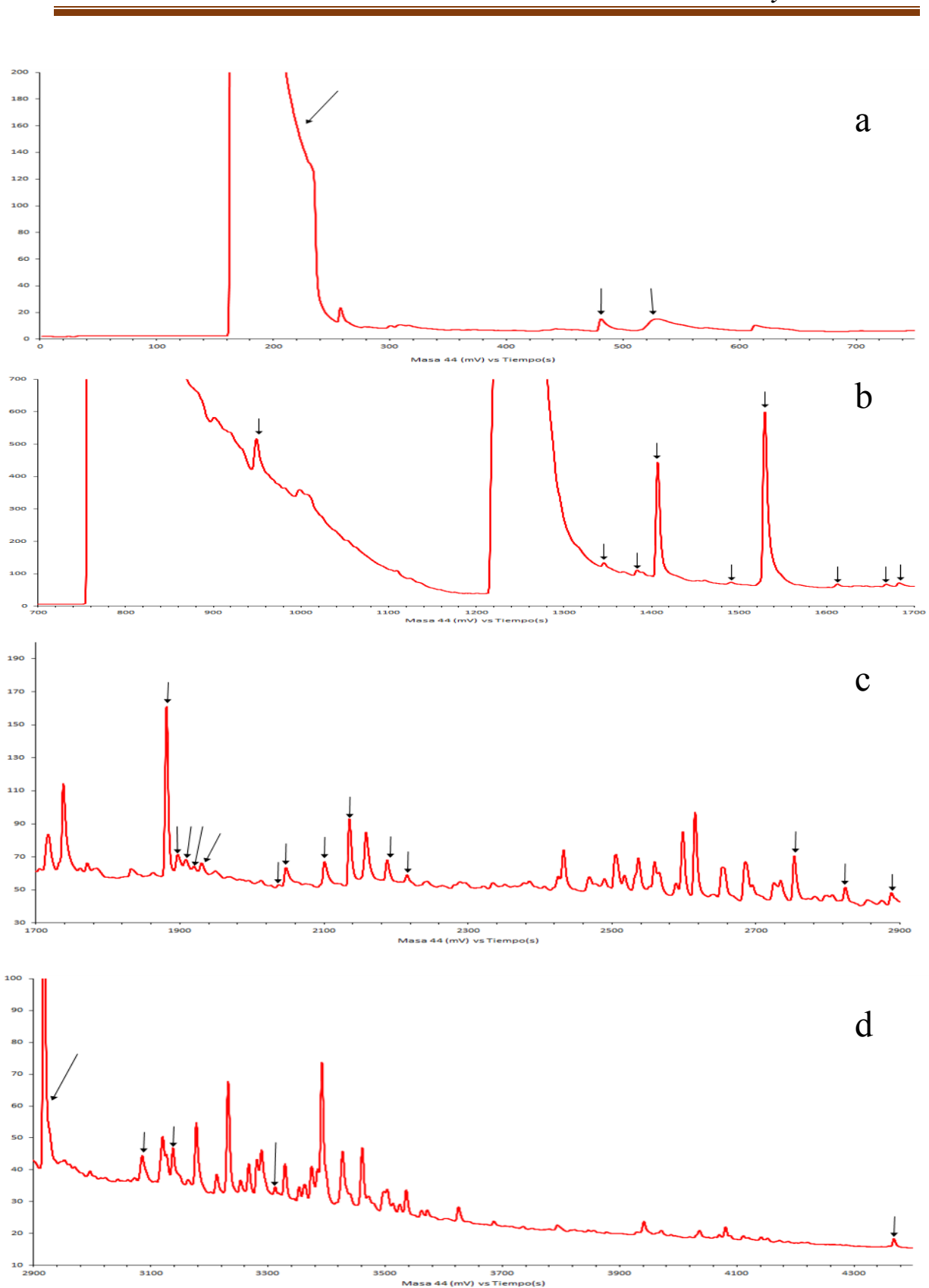


Figura 18: Ampliación del cromatograma GC-C-IRMS de la Figura 17 a) desde 0 a 740 s, b) desde 700 a 1500 s, c) desde 1700 a 2900 s y d) desde 2900 a 2340 s para la identificación visual de los VOCs en el aire separados con una columna DB-5MS de 30m. Se resaltan con una flecha los compuestos presentes en el aire exhalado que no se detectaron en el blanco de bolsa analizado previamente.

Una vez que se han detectado los compuestos procedentes del aliento humano (29 compuestos), se llevó a cabo la medida de las relaciones isotópicas de los mismos. Para medir los deltas en carbono de los compuestos detectados en el aire exhalado, se realizó un experimento muy similar al realizado para estudiar la reproducibilidad y reutilización de las bolsas Tedlar. Se emplearon tres bolsas que se rellenaron una tras otra por el voluntario y se llevó a cabo el análisis empleando el mismo procedimiento que el utilizado en la identificación de los picos en este equipo, analizando previamente una medida de blanco de la bolsa y posteriormente la muestra. El cálculo de los deltas de carbono lo realizó el equipo de manera automática, tras integrar los picos cromatográficos. Una vez calculado, se reutilizó una de las bolsas y se volvieron a calcular los valores $\delta^{13}\text{C}$. En la *Tabla 6* se muestran los valores $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en este experimento.

Tabla 6: Valores $\delta^{13}\text{C}$ de los VOCs procedentes de la muestra de aire exhalado empleando el equipo GC-C-IRMS.

Tiempo de retención(s)	$\delta^{13}\text{C}$ DIA 1			$\delta^{13}\text{C}$ DIA 2		
	Bolsa 1	Bolsa 2	Bolsa 3	Bolsa 1	Promedio	Desviación
163	-6,5	-7,2	-4,8	-5,6	-6,0	1,1
479	-12,0	-8,4	-13,1	-18,2	-12,9	4,1
955	-27,6	-28,2	-27,5	-27,4	-27,7	0,4
1382	-30,4	-30,7	-27,8	-30,6	-29,9	1,4
1405	-25,4	-23,8	-23,3	-26,2	-24,7	1,4
1488	-31,0	-30,5	-30,0	-22,8	-28,6	3,9
1528	-20,4	-21,8	-20,6	-20,8	-20,9	0,6
1609	-20,6	-26,2	-28,4	-23,2	-24,6	3,4
1679	-29,6	-22,3	-29,7	-25,8	-26,8	3,5
1879	-45,0	-44,8	-45,8	-43,1	-44,7	1,1
2048	-21,2	-29,0	-----	-21,5	-23,9	4,5
2101	-32,3	-31,3	-24,3	-26,6	-28,6	3,8
2134	-28,9	-24,1	-23,5	-27,6	-26,0	2,6
2187	-28,1	-44,4	-45,1	-28,7	-36,6	9,4
2215	-19,8	-27,8	-26,9	-31,5	-26,5	4,9
2916	-25,9	-25,7	-24,6	-27,6	-26,0	1,2

La *Tabla 6* presenta los valores $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en tres bolsas Tedlar nuevas, y los obtenidos al reutilizar una de las bolsas al día siguiente (bolsa 1). Como se puede observar, solamente se pudieron calcular los valores $\delta^{13}\text{C}$ de 16 compuestos. No se pudo

realizar en los 29 indicados en la *Figura 18*, ya que muchos de ellos no tenían la sensibilidad suficiente para poder ser integrados y dar resultados reproducibles. Cabe destacar que, al igual que sucedió en el estudio de reutilización de las bolsas, se observó que los resultados entre bolsas oscilan debido al fondo que emiten cada una de ellas. Por ejemplo, la indicada como bolsa 3 emitió mucho más compuestos que las dos restantes. Como resultado el fondo del cromatograma aumentó significativamente, impidiendo la integración correcta de algunos analitos (como por ejemplo el correspondiente al pico con un tiempo de retención de 2048 s).

En general, los valores $\delta^{13}\text{C}$ promedio de estos cuatro análisis oscilan entre -20 y -30, aunque se pueden observar algunas excepciones. La *Figura 19* muestra los valores $\delta^{13}\text{C}$ que se han encontrado en el aire exhalado de los habitantes de Europa [42].

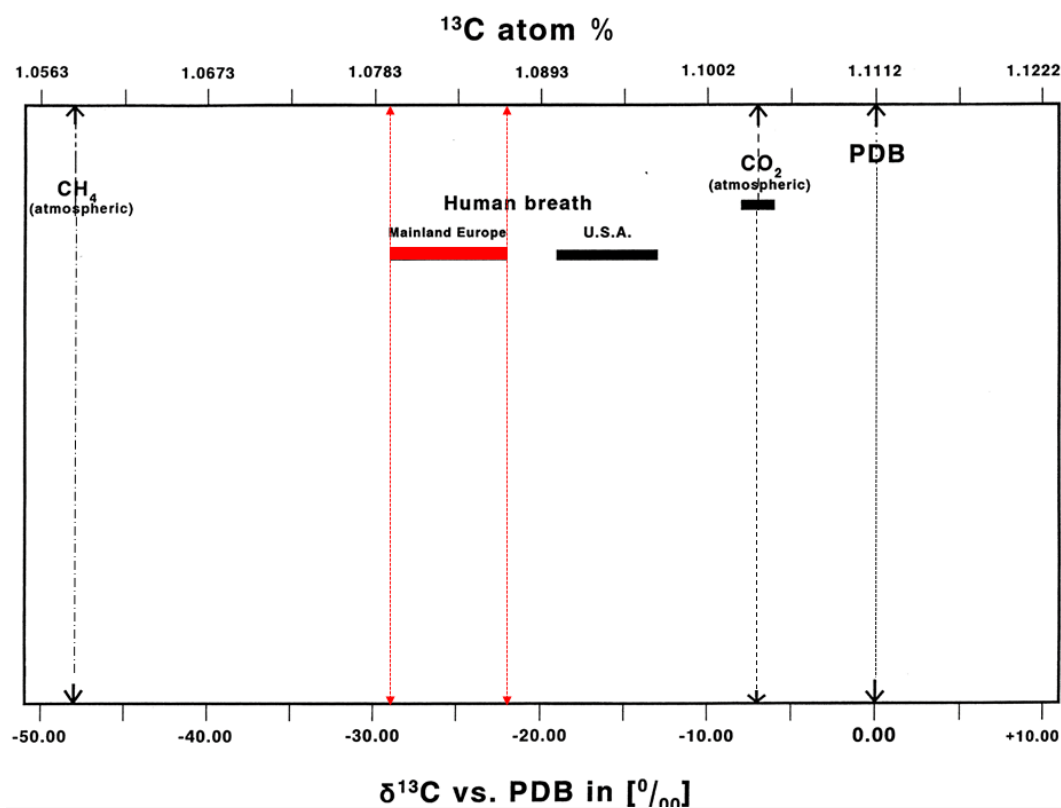


Figura 19: Valores orientativos de $\delta^{13}\text{C}$ relativos al PDB [42].

Como se puede observar comparando la Tabla 6 con la *Figura 19* los valores $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos experimentalmente están dentro del intervalo para el aire exhalado de humanos en Europa (intervalo entre -22 y -28, aproximadamente) [42]. Además se confirma que el pico obtenido a 165 segundos corresponde a CO_2 por su valor $\delta^{13}\text{C}$ de -6,0.

La desviación estándar en los valores $\delta^{13}\text{C}$ nos indica la precisión de las medidas isotópicas. Experimentalmente se obtuvieron desviaciones estándar que oscilan entre 0,4 y 9,4 ‰. Las incertidumbres típicas expresadas como desviación estándar obtenidos al realizar GC-IRMS también denominado CSIA (*Compound specific stable isotope analysis*) al realizar un duplicado o triplicado en las mismas condiciones suelen estar entre 0.1 y 0.3‰, dependiendo de la muestra [43]. Las precisiones obtenidas experimentalmente en este Trabajo Fin de Máster son significativamente más altas debido a que los picos obtenidos no siempre están resueltos en línea de base y a que la sensibilidad de los mismos es muy pequeña lo que dificulta su correcta integración.

Además de la medida de los valores de delta de carbono se midió la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ para cada uno de los compuestos detectados, los resultados se muestran en la *Tabla 7*.

Tabla 7: Relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los VOCs procedentes de la muestra de aire exhalado empleando el equipo GC-C-IRMS.

Tiempo de retención(s)	Relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
163	0,011108
479	0,011047
955	0,010886
1382	0,010896
1405	0,010986
1488	0,011006
1528	0,010698
1609	0,010857
1679	0,010904
1879	0,012326
2048	0,011021
2101	0,010857
2134	0,011181
2187	0,010959
2215	0,011291
2916	0,011039

Los valores que se muestran en la *Tabla 7* se encuentran, todos menos uno, dentro de los límites del intervalo de relaciones isotópicas de carbono natural de la IUPAC, (0,00974-0,01158). Este intervalo teórico se calculó a partir de la composición isotópica del carbono, recogida en el informe de la IUPAC del 2009 [44].

4.4 Estudio de las variaciones en los valores $\delta^{13}\text{C}$ tras la ingesta de glucosa marcada en ^{13}C

La ingesta de glucosa universalmente marcada en ^{13}C por parte del voluntario antes de la toma de muestra de aire exhalado se realizó con la finalidad de estudiar la variación de los valores $\delta^{13}\text{C}$ de los compuestos detectados respecto a los resultados obtenidos en el anterior apartado. En la *Figura 20* se muestra la estructura de la glucosa empleada en el experimento.

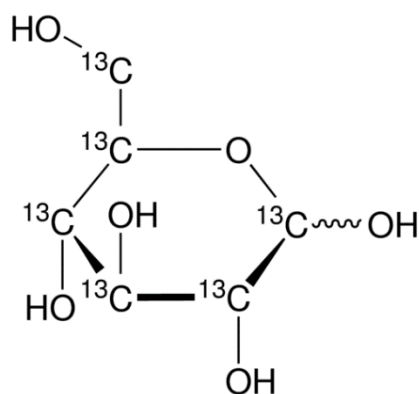


Figura 20: Estructura de la glucosa universalmente marcada en ^{13}C que se administró al voluntario para realizar la medida de su aire exhalado a distintos tiempos tras la ingestión.

La glucosa es el monosacárido más importante en el metabolismo humano. Esta se encuentra en el torrente sanguíneo con una concentración de 0,1% aproximadamente, en las personas que sufren diabetes este porcentaje es mucho mayor. Esta molécula se oxida en los organismos vivos contribuyendo a una serie de reacciones bioquímicas complejas (glucólisis y ciclo de Krebs) proporcionando la energía necesaria para las células.

En caso de ingerirse una molécula de glucosa marcada en ^{13}C , ésta se introduciría en el torrente sanguíneo y las reacciones bioquímicas mencionadas proporcionarían productos que contienen ^{13}C con una abundancia isotópica mayor que la que tendría naturalmente. Esta pequeña variación se observará en el valor $\delta^{13}\text{C}$ de dicho compuesto. Para aumentar

las probabilidades de observar este cambio se tomó la glucosa con todos los carbonos marcados, frente a otras que solo tenían marcado alguno de los carbonos de la molécula.

El cálculo de los deltas de carbono se realizó de la misma manera que la medida de las relaciones isotópicas naturales. Se pudieron calcular los valores de 20 picos distintos y se observó un cambio en el valor de $\delta^{13}\text{C}$, en ocho compuestos. En la *Tabla 8* se muestran los valores $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los diferentes periodos de tiempo en los cuales se realizó el muestreo; antes de ingerirla (0 horas), a los 30 min; 1 h; 2h y 3h.

Tabla 8: Variaciones en el valor $\delta^{13}\text{C}$ de los VOCs tras la ingesta de glucosa universalmente marcada en ^{13}C en los distintos periodos de tiempo en los cuales se realizó el muestreo del aire exhalado al voluntario.

Tiempo de retención (s)	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h
165	-8,6	14,2	18,1	25,5	21,1
1409	-31,9	-17,3	-20,3	-14,5	-8,9
1489	-55,4	-28,8	-15,9	-16,6	17,3
1922	-5,3	1,8	7,9	8,5	5,7
2040	-25,8	-18,3	-14,3	-5,8	-16,0
2887	-22,3	17,5	25,4	-----	11,3
3082	-46,9	-20,2	5,8	-----	-3,4
3313	-24,0	-7,3	-3,4	11,7	-34,3

Los resultados de la *Tabla 8* muestra que antes de tomar la glucosa marcada se los valores $\delta^{13}\text{C}$ son los mismos que los mostrados en la *Tabla 6* para las abundancias isotópicas naturales. Transcurrida media hora de la toma se puede ver que aunque la mayor parte de los compuestos siguen teniendo valores negativos, algunos de los compuestos presentan un cambio hacia valores positivos (lo que indica un enriquecimiento en ^{13}C). Las medidas del aire muestreado tras 1, 2 y 3 horas revelan un cambio en la composición isotópica de los analitos. Como resultado del experimento se ha observado un enriquecimiento en 8 compuestos presentes en el aire exhalado de los 29 que se determinaron inicialmente. Es decir, se ha conseguido una variación en los valores $\delta^{13}\text{C}$ en aproximadamente una cuarta parte de los VOCs detectados. Los analitos restantes obtuvieron unos valores de delta constantes con una precisión que oscila entre 0,3-6,7 ‰.

En la *Figura 21* se representa las tendencias en los valores $\delta^{13}\text{C}$ que se observaron en cuatro analitos representativos durante el experimento de muestreo (compuestos con

tiempo de retención 165 s, 1489 s, 3313 s y 1529.7 s) En el eje X de la *Figura 21* se representó el tiempo en el cual se produjo el muestreo y en el eje Y los valores $\delta^{13}\text{C}$ de los compuestos. Podemos observar que existen analitos que se mantienen constante a lo largo del tiempo y no muestran enriquecimiento (en color verde), analitos que alcanzan su máximo a las dos horas y a las tres horas vuelven a tener los valores iniciales (en color rojo), analitos que alcanzan su máximo a las 3 horas (en amarillo) y analitos que llegan a un máximo y se mantienen constantes (en azul).

La tendencia de cada uno de los compuestos en los cuales se observó enriquecimiento es independiente de los demás, es decir no todos aumentan o disminuyen su valor de delta a la vez. Esto se debe a que estas moléculas son productos del metabolismo, un conjunto de procesos muy complejos, por lo que cada uno de ellos se formará en una etapa más temprana o más tardía. Por ello se puede observar que algunos VOCs alcanzan un valor en delta más positivo trascurrida una hora, mientras que otros lo hacen a las dos horas.

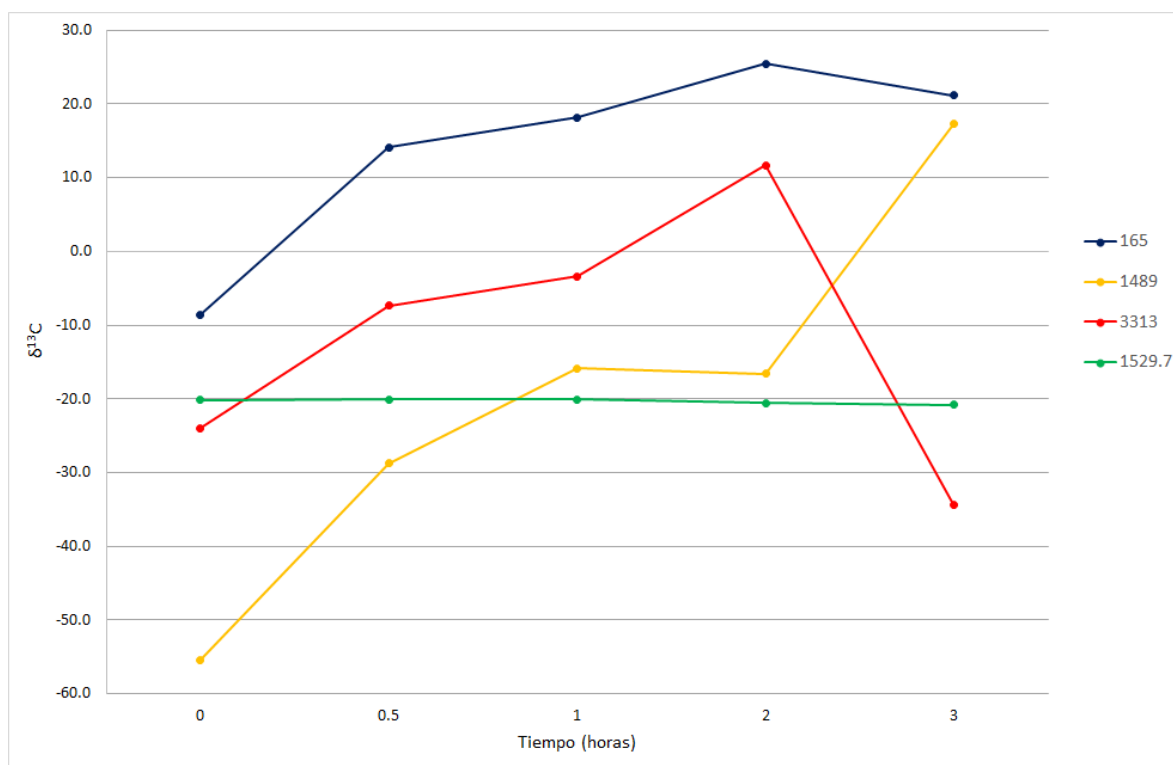


Figura 21: Tendencia en los valores $\delta^{13}\text{C}$ de los VOCs que eluyen a los tiempos de retención 165 s, 1489 s, 3313 s y 1529.7 s.

Cabe destacar que, como se muestra en la *Tabla 8* transcurrido dos horas desde la ingesta no se pudieron aportar los datos de dos compuestos. Esto se debe a la bolsa

empleada. Como se mencionó en el presente trabajo algunas bolsas Tedlar emiten más compuestos que otras haciendo que el fondo del cromatograma sea más alto, llegando a enmascarar los picos.

Otro factor importante a la hora de observar enriquecimiento en los analitos en la cantidad de glucosa marcada ingerida. El voluntario que ingirió la glucosa pesaba 90 kg teniendo, aproximadamente, 6,3 L de sangre en su organismo (se promedia que la cantidad de sangre corresponde a un 7% del peso total). Además la media de glucosa en sangre es de 0,1 %, lo que conlleva que la cantidad total de glucosa es de 6,3g. El voluntario tomó 100 mg de glucosa universalmente marcada en ^{13}C , lo que implicó una variación del 1,6 % de la composición isotópica de la glucosa en su organismo. Esto indica que, aunque la variación en la composición isotópica sea pequeña se puede observar variaciones en los valores delta de los compuestos procedentes del aire exhalado.

5. Conclusiones

A partir de los estudios realizados en el presente Proyecto Fin de Máster se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las bolsas Tedlar empleadas para el muestreo, aunque presentan algún inconveniente, como una emisión de interferentes variable entre bolsas, pueden ser reutilizadas ya que se obtienen resultados reproducibles tanto en la detección de los VOCs como en la medida de las relaciones isotópicas de C en los compuestos. Esta posibilidad permite una reducción importante en el coste de los ensayos.
- La identificación de compuestos presentes en el aire exhalado dependen de la columna cromatográfica empleada para la separación. Con la columna HP-PLOTQ se consiguieron identificar 8 de los compuestos del aliento más volátiles, como el ácido acético o la acetona. En cambio con la columna DB-5MS se pudieron identificar un número mayor de compuestos, obteniendo una mejor resolución cromatográfica empleando 60 m de columna. Aunque se diferenciaron 63 picos presentes en el aire respirado las bases de datos empleadas (Wiley 275 y NIST) solo permitieron identificar 39 compuestos. La metodología llevaba a cabo para la identificación empleando 60 m de columna DB-5MS ofrece mayor resolución que la empleada con la HP-PLOT Q, pese a que conlleva más de dos horas de análisis.
- El estudio de las variaciones naturales en la composición isotópica de carbono específicas de cada compuesto empleando la notación delta confirma que los compuestos detectados proceden del aire exhalado del voluntario. Además al realizar el experimento tras la ingestión de glucosa marcada universalmente en ^{13}C se corroboró que los VOCs en los que se observó una variación en su valor $\delta^{13}\text{C}$ son productos del metabolismo. De esta manera se realizó una discriminación frente a otros compuestos procedentes de fuentes exteriores como puede ser; el tabaco, la alimentación, compuestos de la bolsa Tedlar o compuestos de la fibra SPME.
- Los compuestos en los que se observa un cambio en el valor de $\delta^{13}\text{C}$ proporcionan un punto de partida para el desarrollo de una metodología para la

detección precoz de cáncer de pulmón empleando estos VOCs como posibles biomarcadores en un test clínico.

6. *Bibliografía*

- [1] A. Mazzatenta, C. Di Giulio, M. Pokorski; *Respiratory Physiology and Neurobiology*; 2013; **187**; 128-134.
- [2] A. Mashir , R. Dweik; *Advanced Powder Technology*; 2009;**20**; 420-425.
- [3] R. Madsen, T. Lundstedt, J. Trygg; *Analytica Chimica Acta*; 2010; **659**; 23-33
- [4] N. Rattray, Z. Hamrang, D. Trivedi; *Trends in biotechnology*; 2014; **32**; 538-548
- [5] S. Kischkel, W. Miekish, A. Sawacki; *Clinica Chimica Acta*; 2010; **411**, 1637-1644.
- [6]A. Amann, D. Smith; *Volatile Biomarkers: Non- Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*; 1ª Edición; Amsterdam; Elsevier; 2013; 129-131.
- [7] T. H. Risby; *Disease Markers in Exhaled Breath: Basics Mechanisms and Clinical Applications*; 2002; **346**; 113-122.
- [8] G. Peng, M. Hakim, Y. Broza, S.Billian, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten; *British Journal of Cancer*; 2010;**103**;542-51.
- [9] T. Minh, D. Blake, P. Galassetti; *Diabetes Research and Clinical Practice*; 2012; **97**; 195-205.
- [10] M.Phillips; *Scientific American*; 1992; **267**; 74-79.
- [11] M. Phillips, J.Herrera, S. Krishnan; *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*; 1999; **729**; 75-88.
- [12] L. Pauling, A. Robinson, R. Teranishi; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;1971; **68**; 2374-2376.

- [13] A. Amann, D. Smith; *Volatile Biomarkers: Non- Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*; 1ª Edición; Amsterdam; Elsevier; 2013; 245-246.
- [14] F. Di Francesco, R. Fuoco, M. Trivella; *Microchemical Journal*; 2005; **79**; 405-410.
- [15] J. Li, Y. Peng, Y. Duan; *Oncology/Hematology*; 2013; **87**; 28-40
- [16] R. Rudnicka, M. Walczak, T. Kowalkowski; *Sensors and Actuators, B: Chemical*; 2014; **202**; 615-621
- [17] R. Baker; *Progress in Energy and Combustion Science*; 2006; **32**; 373-385
- [18] A. Amann, D. Smith; *Volatile Biomarkers: Non- Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*; 1ª Edición; Amsterdam; Elsevier; 2013; 177-179
- [19] H. Chan, C. Lewis, P. Thomas; *Lung Cancer*; 2009; **63**; 164-168
- [20] S. Sone, T. Nakayama, T. Honda et al; *Lung Cancer*; 2007; **58**; 329-341
- [21] E. Gaspar, A. Lucena, J. Duro da Costa; H. Chaves das Neves; *Journal Chromatography A*; 2009; **1216**; 2749-2756.
- [22] L. Dominioni, A. Imperatori, F. Rovera et al; *Cancer*; 2000; **89**; 2334-2344
- [23] H. Williams, A. Pembroke; *The Lancet*; 1989; **1**; 734
- [24] J. Church, H. Williams; *The Lancet*; 2001; **358**; 930
- [25] P. Mombaerts; *Current Opinion in Genetics & Development*; 1999; **9**; 315-320.

- [26] G. Taverna, L. Tidu, F. Grizzly et al.; *The Journal of Urology*; 2014; **193**; 1382-1387.
- [27] A. Amann, D. Smith; *Volatile Biomarkers: Non- Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*; 1ª Edición; Amsterdam; Elsevier; 2013; 189-190.
- [28] W. Miekish, J. Schubert, G. Noeldge-schomburg; *Clinica chimica acta: international journal of clinical chemistry*; 2004; **347**; 25-39.
- [29] A. Amann, D. Smith; *Volatile Biomarkers: Non- Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*; 1ª Edición; Amsterdam; Elsevier; 2013; 156-161.
- [30] P. Mochalski, J. King, K. Unterkofler, A. Amann; *Analyst*; 2013; **138**; 1405-1418.
- [31] P. Mochalsi, B. Wzorek, I. Sliwka, A. Amann; *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences*; 2009, **877**; 189-196.
- [32] J. Beauchamp, J. Herbig, R. Gutman, A. Hansel; *Journal of Breath Research*; 2008; **2**; 046001.
- [33] J. Lee, S. Hwang, D. Lee et al; *Bull Korean Chem. Soc*; 2002; **23**; 488-496
- [34] M. Knutson, F. Viteri; *Analytical Biochemistry*; 1996: **242**; 129-135.
- [35] H. Yu, L. Xu, P. Wang; *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences*; 2005; **826**; 69-74.
- [36] H. Lord; *Journal of Chromatography A*; 2007; **1152**; 2-13.
- [37] H. Kataoka, H. Lord, J. Pawliszyn; *Journal of Chromatography A*; 2000; **880**; 35-62.
- [38] R. García, V. Morales, S. Martín; *Chromatographia*; 2014; **77**; 501-509.

- [39] Z. Zhang, J. Pawliszyn; *Instrumentation*; 1993; **1**; 1843-1852.
- [40] X. Yang, T. Peppard; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 1994; **42**; 1925-1930.
- [41] K. Kim, S. Jahan, E. Kabir; *TrAC: Trends in Analytical Chemistry*; 2012; **33**; 1-8.
- [42] W. Meier- Augenstein; *Journal of Chromatography A*; 1999; **842**; 351-371.
- [43] A. Sessions; *Journal of Separation Science*; 2006; **29**; 1946-1961.
- [44] M. Berglund, M. Wieser; *Pure and Applied Chemistry*; 2011; **83**; 397-410.