



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE METABOLÓMICA
NO DIRIGIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS
VOLÁTILES EN AIRE RESPIRADO DE PACIENTES ENFERMOS
DE CÁNCER DE PULMÓN UTILIZANDO ESPECTROMETRÍA DE
MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

Guillermo Viejo Palenzuela

Oviedo, julio 2024

ÍNDICE

Abstract	5
Resumen	6
1. Introducción	7
1.1. Metabolómica	7
1.1.1. Metabolómica dirigida	8
1.1.2. Metabolómica no dirigida	9
1.2. Aplicaciones de la metabolómica.....	9
1.2.1. Ciencias de los alimentos e investigaciones en nutrición	10
1.2.2. Metabolómica ambiental	10
1.2.3. Toxicología	11
1.2.4. Búsqueda de biomarcadores en enfermedades	11
1.2.5. Metabolómica y el estudio del cáncer	11
1.3. Metabolómica y el cáncer de pulmón	11
1.4. Tipos de muestras analizadas en metabolómica	12
1.4.1. Análisis de aire exhalado	13
1.5. Técnicas analíticas empleadas en metabolómica.....	14
1.5.1. Cromatografía de gases.....	14
1.5.2. Cromatografía de líquidos.....	15
1.5.3. Espectrometría de masas en metabolómica	16
1.6. Análisis de datos en metabolómica	18
2. Objetivos.....	19
3. Experimental.....	20
3.1. Materiales y reactivos.....	20
3.2. Instrumentación.....	20
3.3. Procedimiento de preparación de muestras para análisis.....	21
3.3.1. Introducción de patrones en el sistema CSLR	21
3.3.2. Recolección del aire exhalado en los tubos adsorbentes	22
3.4. Condiciones del análisis por cromatografía de gases	24
4. Resultados y discusión	25
4.1. Optimización del sistema de desorción térmica TD100-xr	25
4.1.1. Parámetros generales.....	25
4.1.2. Pre-desorción: purga	26
4.1.3. Parámetros de desorción del tubo	26

4.1.4. Parámetros de la trampa: flujo de gas portador en dirección de muestreo, temperatura de atrapamiento, temperatura de desorción y tiempo de desorción .	29
4.2. Evaluación del sistema de carga del patrón interno y normalización de la señal	33
4.3. Estudio de la linealidad y la variabilidad en el análisis de muestras de aire exhalado	35
4.4. Análisis estadístico de los perfiles metabólicos en diferentes individuos	39
4.4.1. Análisis de datos.....	39
4.4.2. MassHunter Qualitative Analysis: visualización.....	39
4.4.3. MassHunter Unknowns Analysis: deconvolución	40
4.4.4. Libray Editor y MassHunter Quantitative Analysis for Q-TOF	41
4.4.5. Metaboanalyst 6.0.....	43
5. Conclusiones	47
6. Trabajos futuros	48
7. BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXO I. Composición del material certificado de referencia de los 52 compuestos volátiles en metanol.	51

Abstract

Lung cancer is one of the leading causes of death worldwide, making rapid diagnosis vital to enable prompt action and prevent disease progression. Metabolomics, a powerful tool within the “omics” sciences for the development of treatments and clinical diagnostics, allows for understanding the biochemical changes associated with diseases such as cancer. In this context, two complementary methodologies are distinguished: targeted analysis, which aims at the qualitative and quantitative study of one or a very small group of compounds; and untargeted analysis, related to the global analysis of metabolic changes in response to diseases, genetic perturbations, or environmental changes. For both approaches, mass spectrometry (MS) is nowadays the workhorse technique in metabolomics.

In recent years, the analysis of exhaled breath has attracted the interest of researchers, as it allows for the non-invasive discovery of biomarkers for various types of cancer, such as lung cancer. The collected volume is not affected by age, gender, or disease status, and its analysis does not require complex sample preparation procedures that might induce undesirable variability between samples. In this study, we propose the development of a methodology based on a thermal desorption (TD) system coupled with high-resolution gas chromatography (7250 GC-QTOF, Agilent) for the metabolomic analysis of exhaled breath from healthy individuals and lung cancer patients. This study requires the prior optimization of the measurement of volatile organic compounds (VOCs) provided by the Markes TD100-xr system coupled with a GC-QTOF instrument, as well as the evaluation of analytical characteristics. Additionally, an internal standardization methodology for introducing internal standards to the thermal desorption system will be evaluated. The data obtained about the metabolites present in the exhaled breath of healthy individuals allowed us to satisfactorily obtain a metabolic “fingerprint”, useful for the subsequent discrimination between healthy and diseased patients.

Resumen

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo vital un diagnóstico rápido que permita actuar lo antes posible, evitando la evolución de la enfermedad. La metabolómica, una poderosa herramienta dentro de las ciencias “ómicas” para el desarrollo de tratamientos y diagnósticos clínicos, permite comprender los cambios bioquímicos asociados con enfermedades como el cáncer. En este contexto, se distinguen dos metodologías complementarias: un análisis dirigido que apunta al estudio cualitativo y cuantitativo de uno o un grupo muy pequeño de compuestos; o el análisis no dirigido, relacionado con el análisis global de cambios metabólicos en respuesta a enfermedades, perturbaciones genéticas o cambios ambientales. Para ambos enfoques, la espectrometría de masas (MS) es hoy en día la técnica más utilizada para la realización de estudios metabolómicos.

En los últimos años, el análisis del aliento exhalado ha atraído el interés de los investigadores, ya que permite el descubrimiento de biomarcadores de diferentes tipos de cáncer de manera no invasiva, como el cáncer de pulmón. El volumen recolectado no se ve afectado por la edad, el género o el estado de la enfermedad, y su análisis no requiere procedimientos complejos de preparación de muestras que puedan inducir variabilidad no deseada entre las muestras. En el presente trabajo, se propone el desarrollo de una metodología basada en un sistema de desorción térmica (TD) acoplado a cromatografía de gases de alta resolución (7250 GC-QTOF, Agilent) para el análisis metabolómico del aliento exhalado de pacientes sanos y enfermos de cáncer de pulmón. Este estudio requiere la previa optimización de la medida de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) proporcionada por el sistema Markes TD100-xr acoplado a un equipo GC-QTOF, así como la evaluación de las características analíticas. Por otro lado, se evaluará una metodología de estandarización interna para la introducción de patrones internos al sistema de desorción térmica. Los datos obtenidos acerca de los metabolitos presentes en el aire exhalado de individuos sanos, permitieron obtener satisfactoriamente una “huella” metabólica, útil para la posterior discriminación entre pacientes sanos y enfermos.

1. Introducción

1.1. Metabolómica

En los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio de las ciencias “ómicas”, que son un conjunto de disciplinas centradas en el estudio de las moléculas biológicas abordando la detección universal de genes (genómica), ARN mensajero (transcriptómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica) [1].

Los metabolitos se pueden definir como los sustratos y productos del metabolismo que impulsan las funciones celulares vitales, como la producción y almacenamiento de energía, señalización celular o apoptosis [3]. A diferencia de los genes y las proteínas, cuyas funciones están sujetas a la regulación epigenética y modificaciones post-traduccionales, los metabolitos actúan como indicadores directos de la actividad bioquímica y, por tanto, son más útiles para establecer una correlación con el fenotipo. Es esta característica lo que convierte al perfil metabolómico, o a la metabolómica, en una poderosísima herramienta para los diagnósticos clínicos [4].

Los metabolitos se engloban dentro del metaboloma, que incluye todas las moléculas comprendidas entre 50 y 1500 Dalton que tengan diversas características fisicoquímicas, así como una abundancia significativa, dentro de las células, fluidos biológicos, tejidos u organismos. Dentro de las ciencias ómicas, la metabolómica ha revolucionado por completo a lo largo de los últimos años el campo de la investigación contra el cáncer, pues permite detectar de manera muy efectiva metabolitos cuyos niveles estén afectados por la progresión neoplásica en una muestra biológica. Sus aplicaciones van desde la identificación de biomarcadores hasta el desarrollo de fármacos, toxicología clínica o fenotipificación cuantitativa [5]. En relación con estas consideraciones, el hecho de que los metabolitos se distribuyan rápidamente por el organismo en comparación con otras macromoléculas, como las proteínas o los ácidos nucleicos los cuales no suelen ser secretados a los fluidos biológicos, hacen que la metabolómica presente una gran ventaja sobre las otras ciencias ómicas.

Al igual que el resto de ciencias ómicas, la metabolómica es altamente dependiente de las bases de datos. Es por ello que en el año 2004 se lanzó el Proyecto del Metaboloma Humano (HMP), en un esfuerzo por identificar y cuantificar todos los metabolitos detectables ($>1 \mu\text{M}$) en el cuerpo humano. Además, este ambicioso propósito no solo tuvo la tarea de identificar y cuantificar experimentalmente cientos de metabolitos en diferentes fluidos corporales, si no que a lo largo de los años completó y validó la información acerca de todos los metabolitos que habían sido identificados previamente.

Se pudo así proporcionar esta información como una base de datos electrónica de acceso gratuito, que se denominó Base de Datos del Metaboloma Humano (HMDB) [6].

1.1.1. Metabolómica dirigida

A la hora de abordar un análisis metabolómico es extremadamente importante determinar el número de metabolitos que van a ser medidos. En algunas ocasiones resultará interesante estudiar un grupo bien definido de metabolitos empleando una estrategia conocida como metabolómica dirigida (*targeted metabolomics*). Esta disciplina se basa en la medida de un grupo de metabolitos bien definido, caracterizados químicamente y bioquímicamente. A través del uso de patrones internos, los análisis pueden ser llevados a cabo tanto de forma cuantitativa como semi-cuantitativa. Este planteamiento es muy ventajoso para el entendimiento de una inmensa gama de enzimas metabólicas, su cinética y productos finales, así como las rutas bioquímicas conocidas a las que contribuyen [7]. Este enfoque se emplea en aquellas investigaciones motivadas o impulsadas por una incógnita bioquímica específica o una hipótesis acerca de una vía metabólica particular [4]. En la Figura 1 se muestra un ejemplo ilustrativo acerca de la estrategia que se suele emplear para llevar a cabo un análisis de metabolómica dirigida:

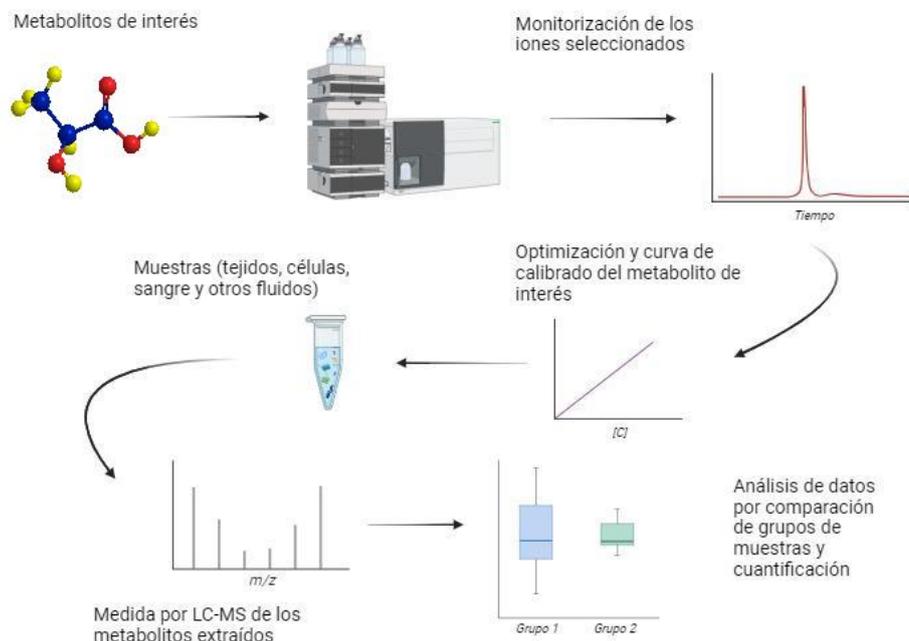


Figura 1. Esquema de un diseño de metabolómica dirigida empleando cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas. Imagen adaptada [4].

1.1.2. Metabolómica no dirigida

Las investigaciones que optan por una vía global donde se midan y comparen tantos metabolitos como sea posible, sin ningún tipo de sesgo, se denominan análisis de metabolómica no dirigida (*untargeted metabolomics*) [4]. A diferencia de la metabolómica dirigida, la no dirigida busca expandir el rango de análisis para proporcionar una “huella” metabólica integral con el máximo número de metabolitos detectados y, posteriormente, identificados. Sin embargo, al no disponer de una hipótesis inicial, se debe hacer frente a serios desafíos, debidos en mayor medida al hecho de que el metaboloma comprende compuestos muy diversos en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, así como una gran variedad en los niveles de concentración [8].

Esta metodología puede ser llevada a cabo mediante el uso de la resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, la combinación de una técnica de separación, como puede ser la cromatografía (tanto de líquidos como de gases), junto con una detección por espectrometría de masas, permite un descubrimiento más eficaz de metabolitos discriminantes entre los distintos grupos estudiados. Así pues, se logra aportar un grado más de selectividad, ya que cada pico, conocido como “característica metabólica”, se corresponde a un ion detectado con una relación masa-carga (m/z) y un tiempo de retención únicos [4]. Como resultado, al utilizar espectrometría de masas de alta resolución, se generan datos masivos de alta dimensionalidad, a menudo con mucho ruido. Estos datos, complejos a la par que ricos en información, requieren un procesamiento extenso para poder interpretar de manera adecuada los resultados. El objetivo es evaluar cómo han sido clasificadas y discriminadas las características metabólicas de cara a un posible descubrimiento de biomarcadores [9]. En la Figura 2 se ilustra cómo se abordaría un experimento de metabolómica no dirigido:

1.2. Aplicaciones de la metabolómica

Los avances en las técnicas analíticas y los métodos computacionales para el tratamiento de datos, junto con el rápido crecimiento del campo de la metabolómica, ha permitido crear una simbiosis entre esta disciplina y los datos derivados de la genómica, transcriptómica y proteómica, proporcionando un enfoque excepcional en el campo de

la biología de sistemas [10]. Es por ello que la metabolómica tiene muchas aplicaciones en diversas áreas.

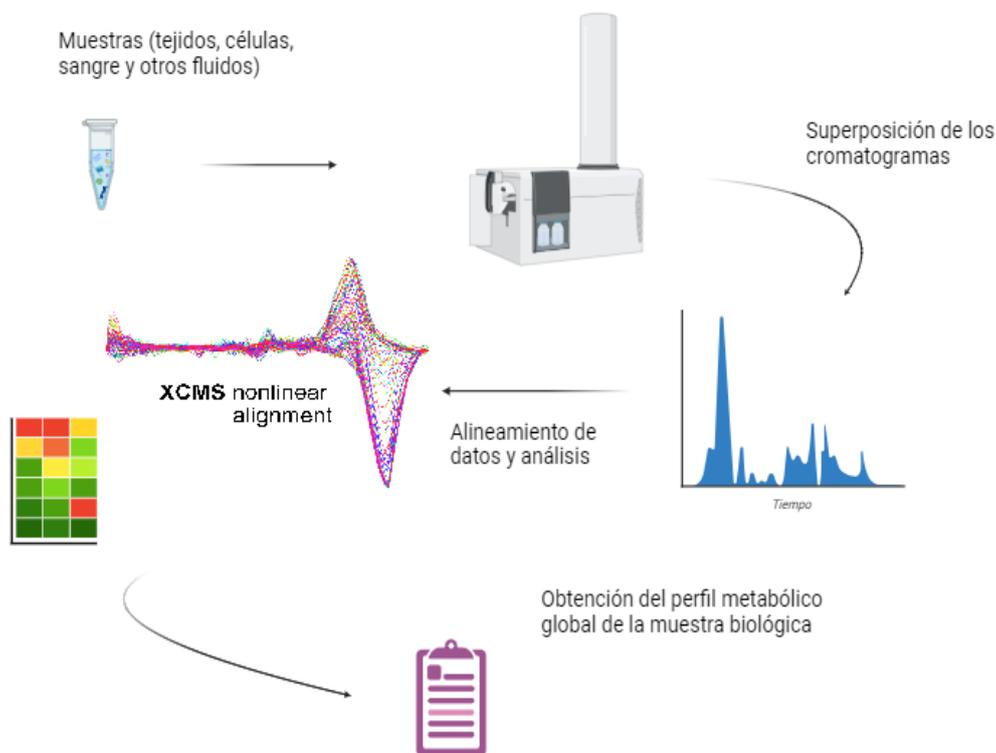


Figura 2. Esquema de un diseño de metabolómica no dirigida empleando cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas de alta resolución. Imagen adaptada [4].

1.2.1. Ciencias de los alimentos e investigaciones en nutrición

Debido a que la metabolómica permite la caracterización simultánea de una gran cantidad de compuestos en matrices biológicas, ofrece a los investigadores de las ciencias de alimentación y nutrición una gran oportunidad para obtener una “imagen” molecular mucho más detallada y completa de la composición de los alimentos, así como de su consumo y de los efectos biológicos moleculares a través de diferentes dietas [11].

1.2.2. Metabolómica ambiental

La metabolómica se está empleando cada vez con más asiduidad en ciencias ambientales, no solo para comprender los mecanismos biológicos del estrés ambiental en los organismos, si no también para entender las interacciones entre metabolitos y moléculas funcionales que hayan sido inducidas por el estrés ambiental. Dicho estrés puede surgir de distintos factores como los contaminantes químicos, la dieta, los patógenos, el envejecimiento e incluso el cambio climático [12].

1.2.3. Toxicología

Hasta la fecha, la metabolómica probablemente haya tenido su mayor impacto en el área de la toxicología, en especial en la toxicología preclínica. El potencial que ofrece esta rama se despliega a través de las aplicaciones del espectro del desarrollo farmacéutico. Dentro de la toxicología preclínica, hay tres áreas donde la metabolómica tiene un enorme impacto, y que están intrínsecamente relacionadas con la evaluación de la seguridad de agentes terapéuticos. Se tratan del cribado, los biomarcadores de seguridad y el mecanismo de acción [13].

1.2.4. Búsqueda de biomarcadores en enfermedades

Un biomarcador se define como una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica [14]. El gran desafío que afronta la metabolómica actualmente es ir más allá de la identificación de los diferentes metabolitos, y comenzar a usarlos como biomarcadores. Esto abre la posibilidad de establecer los roles fisiológicos directos de los metabolitos, y su participación en las redes metabólicas, además de determinar cómo los cambios en sus niveles están implicados en los diferentes resultados fenotípicos [3].

La gran mayoría de los biomarcadores aplicados actualmente son metabolitos individuales, que proporcionan una discriminación adecuada entre poblaciones (población sana frente a población que padezca una enfermedad bajo estudio, por ejemplo). No obstante, cuando una característica metabólica no produce una discriminación adecuada, los estudios actuales se decantan por emplear conjuntos de biomarcadores metabólicos con los cuales se puedan determinar reglas para el diagnóstico o el pronóstico [15].

1.2.5. Metabolómica y el estudio del cáncer

En el cáncer, las células malignas adquieren adaptaciones metabólicas en respuesta a una variedad de señales celulares tanto extrínsecas como intrínsecas. Algunas de esas adaptaciones inician el proceso de transformación, mientras que otras promueven el crecimiento de las células malignas y las vuelven susceptibles a inhibir rutas metabólicas clave [16].

1.3. Metabolómica y el cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad en la que se produce un crecimiento celular descontrolado en los pulmones, formando tumores malignos. Hoy en día supone un gran problema en el mundo, y a pesar de los incesantes esfuerzos por avanzar en su

diagnóstico y tratamiento, sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer, presentando además una tasa de supervivencia 5 años más bajas que para otros tipos de cáncer [17].

En la actualidad, el número de casos de cáncer de pulmón se está incrementando, probablemente debido al creciente consumo de tabaco y a los bajos ingresos en países en desarrollo. El tabaquismo tiene una estrecha relación con esta enfermedad y su cese tiene un componente imperativo en su prevención. Sin embargo, se estima que el 25 % de todos los casos de cáncer de pulmón se observan en personas que nunca han fumado, siendo probable que esta cifra aumente en el futuro. Por tanto, comprender el papel de los factores de riesgo no relacionados con el tabaco es cada vez una tarea más importante [17].

Los métodos actuales para el diagnóstico del cáncer de pulmón se realizan principalmente a través de exámenes físicos, bioquímicos e histopatológicos. Mediante estos métodos tradicionales, se determina la etapa, ubicación y metástasis del cáncer, proporcionando una base confiable para un tratamiento posterior. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones, como dificultades en el diagnóstico precoz, un elevado coste en los exámenes, junto con una inadecuación para el cribado poblacional [18]. Por todo ello, se necesitan de manera inmediata nuevos métodos que puedan detectar de forma temprana la enfermedad, mejorando así el pronóstico del tratamiento del cáncer de pulmón. La identificación de características metabólicas discriminantes para un diagnóstico rápido en un estadio prematuro, la comparación de los cambios en los metabolitos antes y después de someterse a una cirugía, o el descubrimiento de posibles vías metabólicas, son algunas de las opciones que se están explorando cada vez más frecuentemente [18].

1.4. Tipos de muestras analizadas en metabolómica

El biomarcador ideal debería cumplir ciertos criterios, que incluyen: (i) estar presente en fuentes fácilmente accesibles y ser mínimamente invasivas; (ii) ser altamente sensible y específico; (iii) variar rápidamente en respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad; (iv) proporcionar una comprensión más profunda del mecanismo de la enfermedad; y (v) debe ser útil en la estratificación del riesgo y el pronóstico.

Los cambios en los metabolitos normalmente aparezcan en biofluidos fácilmente disponibles, como la sangre y la orina. Se pueden analizar otros fluidos, como el seminal, el líquido amniótico, la saliva, el líquido cefalorraquídeo o los fluidos sinoviales. Los fluidos biológicos suelen ser las muestras más fáciles para trabajar, requiriendo menos preparación de muestra que otros tipos de muestras biológicas, como los tejidos

[19]. Sin embargo, existe un método que reúne todas las condiciones anteriores y, además, no se ve tan afectado por los posibles efectos de matriz que tendría una muestra biológica. Se trata del aire exhalado.

1.4.1. Análisis de aire exhalado

El análisis de aire exhalado se ha convertido en un campo de investigación de elevado interés en los últimos años gracias al gran potencial que presenta para el diagnóstico clínico y su naturaleza no invasiva [20]. Su estudio metabolómico, conocido en inglés como “*breathomics*”, es una nueva disciplina muy prometedora con un gran potencial para la detección de patologías. El aliento contiene trazas de un amplio rango de compuestos orgánicos, que pueden servir como biomarcadores capaces de indicar la presencia, el grado o la progresión de una enfermedad particular. Hasta la fecha, el análisis del aliento se ha estudiado para diversas patologías, como son el asma, enfermedades gástricas y colorrectales, diabetes, cáncer de pulmón e incluso enfermedades infecciosas como la reciente COVID-19 [21].

La composición del aire exhalado es una mezcla de nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono, agua, gases inertes y una pequeña fracción restante constituida por los componentes traza, a nivel de nanomoles y picomoles. La gran mayoría de dichos componentes traza son compuestos orgánicos volátiles (por sus siglas en inglés, VOCs) y pueden ser generados por el cuerpo humano, denominados endógenos, o ser absorbidos como contaminantes del entorno, siendo exógenos. Las moléculas exógenas, especialmente los compuestos orgánicos halogenados, se analizan con el fin de buscar problemas ambientales relacionados con la exposición y evaluación específica del compuesto en el cuerpo humano, así como su eliminación. Sin embargo, cuando se monitoriza un proceso o ruta metabólica, se deben estudiar las sustancias endógenas [22]. Ciertos VOCs derivados del cáncer pueden difundirse a través de los alveolos pulmonares y ser liberados en el aire exhalado, donde su concentración es representativa de la concentración en la sangre, como se ha demostrado en otras investigaciones. Para llevar a cabo estos análisis, la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas se considera la piedra angular para la identificación de los biomarcadores en el aire exhalado humano. Mediante la comparación de individuos sanos frente a pacientes con cáncer de pulmón, es posible identificar VOCs altamente específicos de esta patología. No obstante, los resultados que se obtienen son altamente heterogéneos, debido a las diferentes estrategias empleadas para la recolección de muestra, la condición del paciente o factores como el entorno [23]. En la Figura 3 se muestra una esquematización de la composición del aire

exhalado en humanos, siendo el porcentaje de VOCs muy pequeño frente a los componentes mayoritarios, el nitrógeno y el oxígeno.

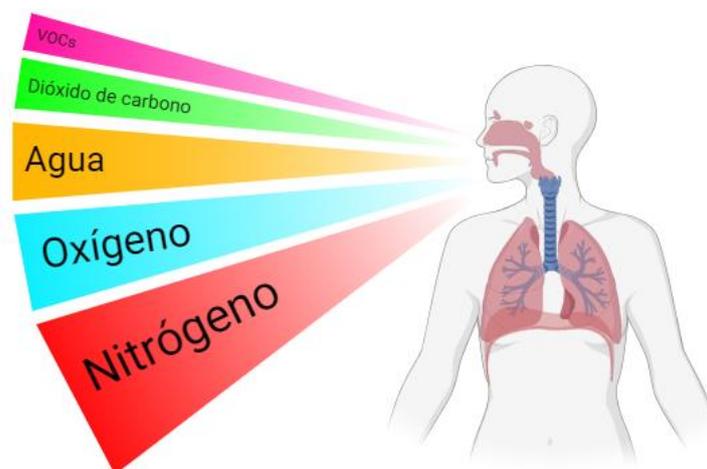


Figura 3. Composición del aire exhalado en humanos.

1.5. Técnicas analíticas empleadas en metabolómica

Uno de los mayores desafíos a los que hace frente la metabolómica es al enorme rango de estructuras, propiedades y concentraciones que pueden tener los metabolitos en muestras biológicas. Hoy en día, como en muchas otras áreas de la química analítica, no existe una técnica completa capaz de identificar y detectar los incontables tipos y niveles de metabolitos existentes en un ser vivo. En su lugar, ese trabajo involucra normalmente la ya mencionada combinación de una técnica cromatográfica o un método de separación, como la extracción, con una segunda técnica analítica, que suele ser la resonancia magnética nuclear o la espectrometría de masas (MS). En torno a un 30 % de las publicaciones más recientes acerca de la metabolómica usan el RMN, mientras que el 70 % restante emplean la espectrometría de masas, habiendo incluso en alguna ocasión una dualidad de ambas técnicas, aunque no es lo habitual [24].

1.5.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC en inglés) es una técnica analítica utilizada para separar compuestos de bajo peso molecular, volátiles y térmicamente estables. No obstante, esta limitación puede solventarse mediante reacciones de derivatización a través de modificaciones en los grupos polares de las moléculas, transformando los compuestos en sustancias más volátiles a la par que térmicamente estables. En este tipo de cromatografía la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria, en la mayoría de los

casos, es un líquido adsorbido sobre una superficie sólida. Desde el puerto de inyección, la muestra se introduce en el sistema cromatográfico, vaporizándose y siendo arrastrada por el gas portador. Una vez dentro, recorre la fase estacionaria, que recubre el interior de la columna cromatográfica, ubicada dentro del denominado horno. El horno puede controlar la temperatura del interior, sometiendo a la muestra a un programa de temperaturas, pudiendo separar exitosamente los componentes de la mezcla en función de su volatilidad [25].

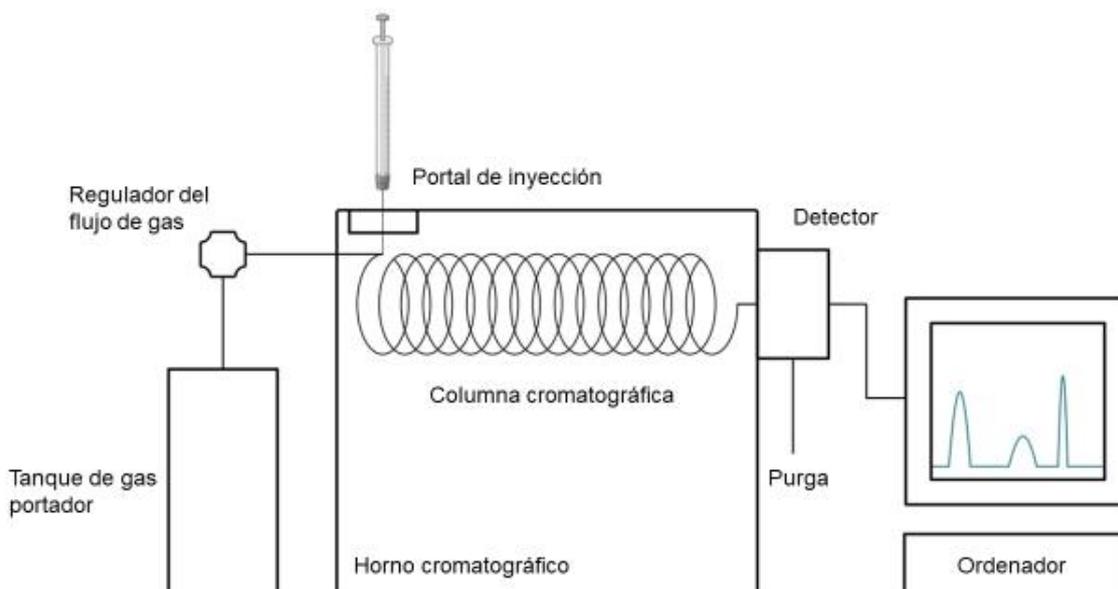


Figura 4. Esquema de un equipo de cromatografía de gases convencional. Imagen adaptada de: <https://bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/>.

1.5.2. Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos (HPLC por sus siglas en inglés cuando se habla de alto rendimiento) es una de las técnicas de separación más empleadas en los laboratorios tanto de rutina como de investigación gracias al gran campo de aplicación que presenta. En esta técnica analítica, la fase móvil es un líquido o mezcla de líquidos, que se bombea a alta presión a través de la columna cromatográfica. En esa columna se encuentra la fase estacionaria, la cual consiste en pequeñas partículas porosas de gran área superficial a las que se unen diferentes ligandos. En función del tipo de fase estacionaria empleada, los analitos interaccionarán de una forma u otra, eluyendo a diferentes tiempos. Existen diferentes tipos de mecanismos de retención: cromatografía en fase normal y fase reversa; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de afinidad; y cromatografía de exclusión por tamaños. Gracias a la gran variedad de fases

estacionarias disponibles y de las diversas composiciones de la fase móvil, se puede alterar la selectividad del sistema, y retener aquellas especies que interesen [26].

1.5.3. Espectrometría de masas en metabolómica

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la ionización de los elementos o compuestos, someter dichos iones a una serie de campos electromagnéticos y detectarlos generando corrientes eléctricas amplificadas. De este modo los analitos se identifican y cuantifican a partir de la medición de su relación masa-carga (m/z) y de su intensidad de corriente, respectivamente. Los espectrómetros de masas cuentan con tres componentes principales. El primero es la fuente de iones, donde las moléculas se ionizan y adquieren por tanto carga. En función de las propiedades del analito y la energía que se desee transmitirle, se elige una fuente u otra. Las más comunes son la fuente de ionización electrónica (EI), la fuente de ionización de electropray (ESI) o la fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP). Después se encuentra el analizador de masas, encargado de separar los iones generados en la fuente de ionización según su m/z . Existen muchos factores a la hora de escoger el analizador: el rango de masas, la velocidad de análisis, la exactitud de masa o la resolución del analizador, entre otros.

El cuadrupolo es el analizador de masas más empleado, debido a su bajo coste, robustez y fiabilidad. Consiste en cuatro barras cilíndricas en paralelo, a las que se les aplica un potencial de radiofrecuencia. Cuando se impone una corriente continua, se comporta como un filtro de masas, debido a la capacidad de discriminar y filtrar iones de diferente m/z . Aquellos iones que tengan una trayectoria inestable colisionan con las varillas y son filtradas fuera. La principal desventaja que presenta es el bajo rango de masas y su pobre resolución, limitando los análisis de moléculas de elevado peso molecular o mezclas complejas [27].

Los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) consisten en un tubo y una rejilla de aceleración que actúa para acelerar un “paquete” de iones desde la fuente de ionización al detector. Si dos iones de diferentes m/z son acelerados con la misma energía cinética y viajan a través de una región libre de campos, el tiempo en llegar al detector será diferente para cada ion. Debido a la elevada eficiencia de transmisión, los analizadores TOF pueden lograr el rango de masas más amplio de todos los analizadores de masas. Hoy en día, todos los TOF contienen un “reflectrón”, un espejo iónico ubicado al final del tubo de tiempo de vuelo que invierte la dirección de los iones que han viajado a través del tubo. Los iones con más energía penetran más profundamente y, por lo tanto, tardan

más en volver al detector, corrigiendo así pequeñas diferencias en las energías cinéticas iniciales de los iones [27].

Los espectrómetros de masas que utilizan dos o más analizadores consecutivos se conocen como espectrómetros de masas en *tándem*. El análisis de masas en *tándem* es un proceso en el cual el primer analizador se emplea para seleccionar iones con una m/z en particular, someterlo a un proceso de colisión donde se fragmenten y después analizar los iones productos resultantes. El ejemplo más común es el triple cuadrupolo, un sistema donde se acoplan tres cuadrupolos, siendo el segundo (normalmente un hexapolo) el que funciona como celda de colisión. No obstante, si se dispone un cuadrupolo ortogonalmente con un TOF (Q-TOF), se logra una configuración donde los iones que son filtrados entran al TOF como un paquete, incrementando enormemente la exactitud de masa y la resolución, además de lograr una mayor velocidad de escaneo. Estas características permiten que se adquieran muchos espectros cuando existan muchas especies co-eluyendo, siendo esencial en la metabolómica no dirigida [27].

Finalmente se ubica el detector, el cual detecta los iones separados por el analizador de masas y genera una señal que puede ser procesada para obtener el espectro de masas. Algunos ejemplos serían el multiplicador de electrones, la copa de Faraday, o los detectores de placas microcanal.

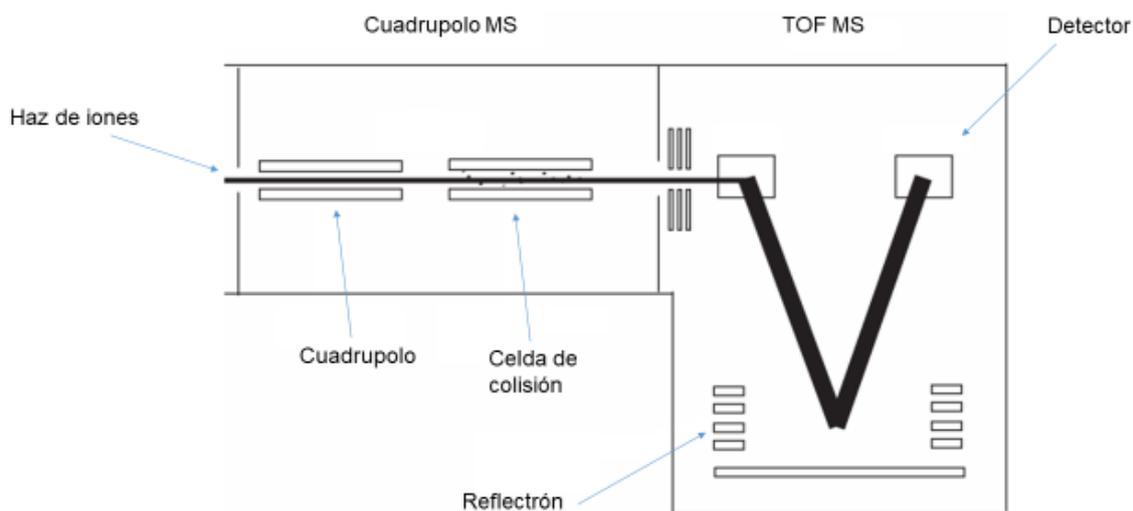


Figura 5. Esquema de un analizador de masas tipo Q-TOF. Imagen adaptada [28].

1.6. Análisis de datos en metabolómica

Los análisis estadísticos más comunes de datos metabolómicos incluyen el análisis univariante y multivariante. Este enfoque permite la evaluación del conjunto de datos y la identificación de los metabolitos que sufran cambios inusuales. Posteriormente, los metabolitos que tengan una cierta relevancia se pueden distinguir a través de otros mediante métodos que comprendan una extracción de datos. No obstante, los métodos estadísticos tradicionales determinan las relaciones entre variables basándose exclusivamente en criterios matemáticos, sin tener en cuenta plenamente las correlaciones biológicas, creando una gran limitación. Por tanto, se recomienda el uso combinado de múltiples técnicas estadísticas a la hora de realizar un análisis metabolómico. En este contexto, se utiliza un *p-valor* apropiado para clasificar los metabolitos expresados significativamente y determinar un umbral confiable, para seleccionar así el más significativo [29].

2. Objetivos

El presente trabajo de Fin de Máster tiene como objetivo general el desarrollo de una metodología de metabolómica no dirigida para la determinación de biomarcadores de cáncer de pulmón en aire exhalado. Para cumplir con este objetivo, se ha empleado un novedoso sistema de desorción térmica (*Markes TD100-xr* de la casa comercial Markes International) acoplado a un Cromatógrafo de Gases con detección por Espectrometría de Masas de alta resolución (GC-QTOF).

Este objetivo general se ha llevado a cabo a partir de los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización de los diferentes parámetros del sistema de desorción térmica para la medida de compuestos orgánicos volátiles (VOC's).
2. Evaluación de las características analíticas de la metodología.
3. Evaluación de un método de estandarización interna mediante la adición de 9 patrones internos que no están presentes en muestras reales.
4. Evaluación de la reproducibilidad en muestras reales de individuos sanos.

3. Experimental

3.1. Materiales y reactivos

Todos los reactivos empleados, así como los disolventes, fueron de calidad analítica, suministrados por distintas casas comerciales. Los patrones utilizados tenían una elevada pureza, típicamente superior al 99 %. Estos patrones fueron: *52 Component Indoor Air Standard* (47537-U, Sigma-Aldrich); benceno D₆ (99,9 %, Supelco-Sigma-Aldrich), 1,2-dicloroetano D₄ (99,9 %, Supelco-Sigma-Aldrich); fenol 1 ¹³C (99 %, Cambridge Isotopes Laboratories); EPA 8260 International Standard Mix [pentafluorobenceno 99,2 %; 1,4-difluorobenceno 100 %; clorobenceno D₅ 99,0 %, 1,4-diclorobenceno D₄ 98,7 %] (Sigma-Aldrich); hexadecano D₃₄ (99,0 %, Sigma-Aldrich). El disolvente utilizado fue metanol de grado HPLC (≥ 99,9 %, Honeywell).

Todos los patrones empleados se prepararon gravimétricamente y siempre en la campana de extracción, cerrando herméticamente los viales, pues se trataban de compuestos altamente volátiles y algunos con cierto grado de toxicidad si había una exposición prolongada. Inicialmente se preparaba una disolución stock, y se iban realizando sendas diluciones hasta llegar a la concentración dentro del intervalo requerido, normalmente comprendido entre 1 y 50 ppm. Como disolvente siempre se utilizó metanol.

3.2. Instrumentación

Para la realización de las medidas cromatográficas se usó un cromatógrafo de gases Agilent 8890 GC system, con detección por espectrometría de masas de alta resolución mediante un analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo, Agilent 7250 GC/Q-TOF. Acoplado al cromatógrafo se encontraba el sistema de desorción térmica, denominado TD100-xr Automated Thermal desorber, de la casa comercial Markes International. Los tubos que contenían el sorbente, pertenecían también a la casa comercial Markes International y fueron C2-AAXX-5149 Stainless Steel Conditioned TD-Tubes Tenax TA/Carbograph 5TD. Para la recolección de muestra, se dispuso de un BioVOC-2 breath sampler, de Markes International. En cuanto al acondicionamiento de los tubos, y de la misma casa comercial que los anteriores productos, Markes International, se utilizó el Tube Conditioner TC-20. Para la introducción de las disoluciones patrón preparadas, se empleaba el Calibration Solution Loading Rig (CSLR; Markes International), diseñado para cargar los tubos adsorbentes con un estándar en fase líquida (aunque sería posible también trabajar en fase gas). Dicho patrón se inyectó con una jeringa de vidrio de alta precisión para un volumen máximo de 10 µL (Hamilton®). Con el fin de comprobar el

flujo de nitrógeno que circulaba a través del CSLR, se requirió de un flujómetro Perkin Elmer-FlowMark.



Figura 6. Instrumentación empleada de la casa comercial Markes International, Hamilton® y Perkin Elmer. ① se corresponde con el sistema de desorción térmica; ② son los tubos adsorbentes, sellados con tapones especiales de latón; ③ es el acondicionador de los tubos adsorbentes; ④ es el flujómetro, encargado de obtener el valor del flujo de nitrógeno a través del sistema CSLR; ⑤ es el sistema de recolección de aire exhalado, BioVOC-2; y ⑥ es el CSRL junto con la jeringa de precisión Hamilton, dispuesto para cargar un tubo adsorbente con un posible estándar.

En la Figura 6 se muestran los instrumentos empleados pertenecientes a la casa comercial Markes International, Hamilton® y Perkin Elmer.

3.3. Procedimiento de preparación de muestras para análisis

3.3.1. Introducción de patrones en el sistema CSLR

Los tubos adsorbentes, se acondicionan en el acondicionador de tubos TC-20 a 300 °C durante 90 minutos. Una vez acondicionados los tubos están listos para ser cargados con una disolución patrón que contenga los compuestos de interés a analizar. Inicialmente, se abre la línea de nitrógeno para que pueda circular por el sistema CSLR. Después, se coloca el tubo a favor del flujo de gas, es decir, con la flecha que contiene el propio tubo en la carcasa mirando hacia abajo. Con la ayuda de una llave inglesa, se ajusta hasta un máximo, para evitar que el tubo se desprenda. Seguidamente, se abre el flujo de nitrógeno con la válvula incorporada en el CSRL para que circule a través del tubo, y con el flujómetro se mide dicho caudal, cuyo valor debe ser en torno a 100 mL min⁻¹. Posteriormente, con la ayuda de la jeringa Hamilton, se introduce 1 µL de la disolución patrón requerida a través del portal de inyección, y se retira cuidadosamente.

Finalmente, se cierra el gas, se afloja la unión entre el CSLR y el tubo, y se tapa lo más rápidamente posible, para evitar posibles fugas de aquellos compuestos más volátiles. En la Figura 7 se observan detalladamente los distintos componentes del sistema CSLR.

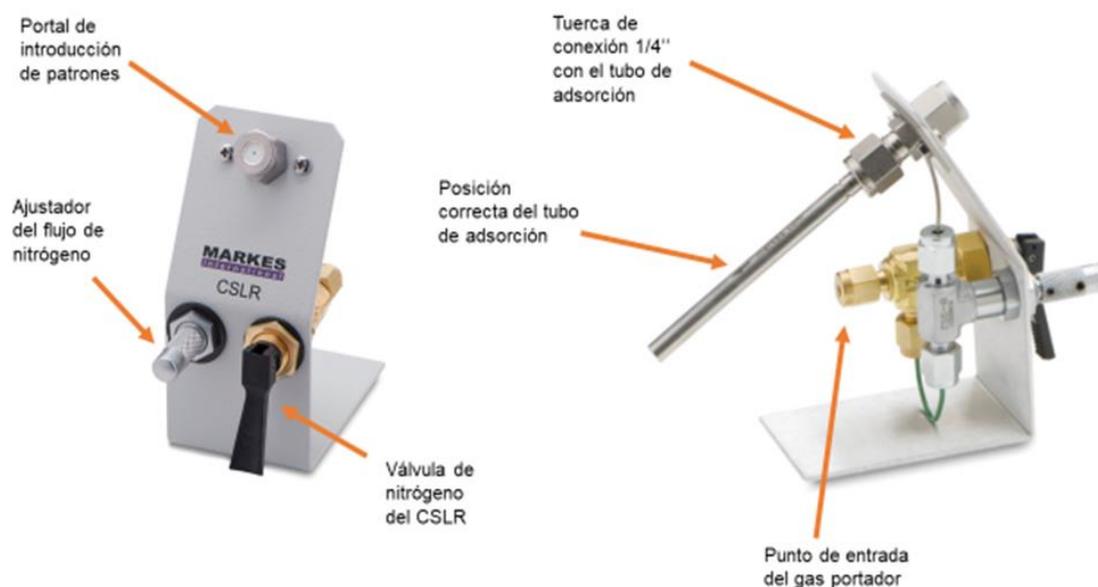


Figura 7. Componentes del sistema CSLR para la introducción de patrones en el tubo adsorbente. Imagen adaptada.

3.3.2. Recolección del aire exhalado en los tubos adsorbentes

La recolección de aire exhalado se realizó a través de un sistema BioVOC-2, (Figura 8). Este instrumento, semejante a una jeringa de gran tamaño, permite almacenar el aire tras la exhalación, y empujarlo mediante un émbolo hacia el tubo adsorbente. El sistema está constituido íntegramente de teflón, otorgando así un carácter inerte, evitando a su vez la interacción de los analitos y un posible efecto memoria.



Figura 8. Componentes del BioVOC-2. Imagen adaptada.

La secuencia de operación para la realización del muestreo sería la siguiente. En primer lugar, se coloca la boquilla de cartón desechable, como se muestra en la Figura 8, junto con el tapón del lado contrario, para evitar pérdida de muestra. El individuo respira de forma calmada varias veces antes de proceder a introducir la boquilla en su boca y exhalar durante un tiempo prolongado en el BioVOC-2, hasta no poder seguir emitiendo aire. De este modo el dispositivo recoge los últimos 129 mL de aire exhalado del paciente. Seguidamente, la boquilla se retira y se desecha, y se coloca el émbolo en el lugar donde antes se encontraba la pieza de cartón, girando cuanto fuese posible hasta que el recipiente estuviera completamente estanco. A continuación, se sustituye el tapón contrario al émbolo por el tubo adsorbente correspondiente, atendiendo siempre a que la flecha esté a favor del flujo de aire exhalado que va a recibir, y no apuntando hacia el cuerpo del BioVOC-2. Finalmente, y con una duración de 10 segundos aproximadamente, se empuja el émbolo hasta completar la trayectoria, reposando otros 5 segundos antes de retirar el tubo y sellarlo con los tapones, nuevamente lo más rápido posible. En la Figura 9 se recoge un resumen gráfico de las diferentes etapas del proceso de recogida de aire exhalado usando un BioVOC-2.



Figura 9. Etapas del proceso de muestreo de aire exhalado empleando un BioVOC-2. Imagen adaptada.

3.4. Condiciones del análisis por cromatografía de gases

El cromatógrafo de gases Agilent 8890 GC system consta de una columna capilar HP-5MS UI de 15 m x 250 μm ID x 0,250 μm de espesor de fase estacionaria, Agilent Technologies. Como gas portador se empleó helio (99,999 %), a un flujo de 1,4 mL min^{-1} . La temperatura del inyector se estableció en 200 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del horno se mantuvo a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos, luego se incrementó a 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 320 $^{\circ}\text{C}$, y se conservó a esa temperatura durante 4 minutos. La fuente de ionización se mantuvo a 280 $^{\circ}\text{C}$.

4. Resultados y discusión

4.1. Optimización del sistema de desorción térmica TD100-xr

4.1.1. Parámetros generales

La temperatura del gas portador del sistema “*flow path temperature*” debe ser lo suficientemente alta para prevenir la condensación de los analitos, pero no excesivamente elevada como para causar la degradación de los compuestos lábiles. El fabricante no recomienda temperaturas superiores a 150 °C para evitar problemas de condensación de los compuestos. Por lo tanto, se evaluaron temperaturas de 120, 130, 140 y 150 °C.

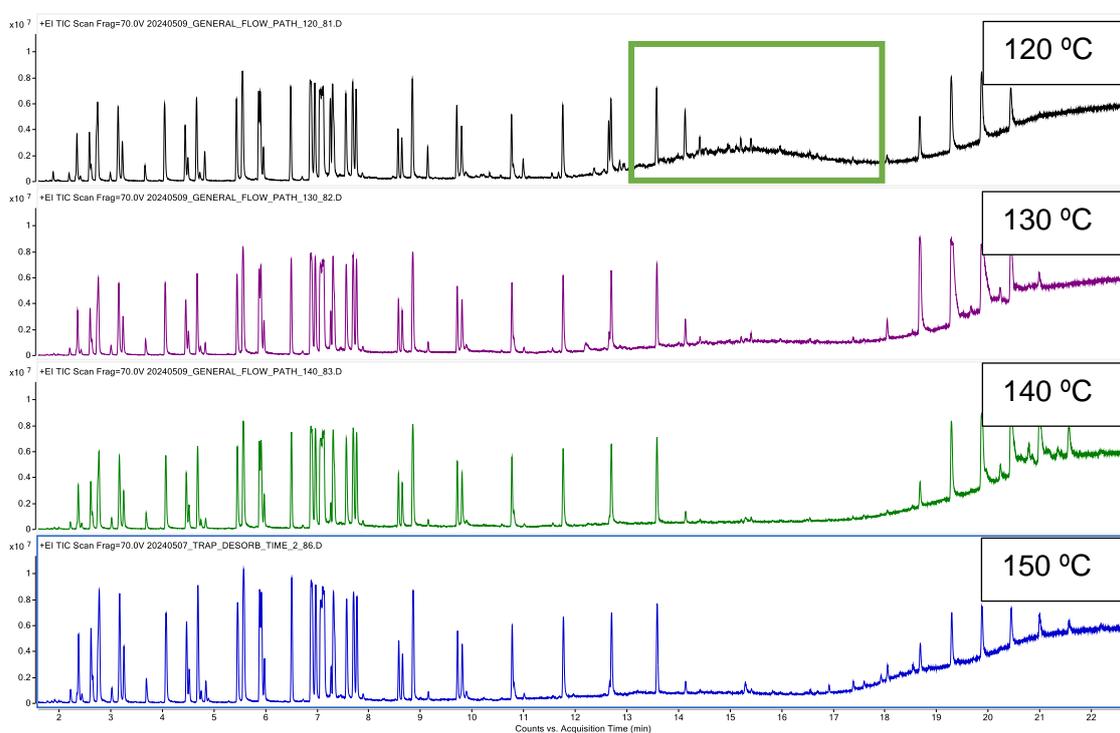


Figura 10. Cromatograma del material certificado de referencia de 52 compuestos volátiles obtenido a diferentes temperaturas de flujo de gas portador.

En la Figura 10 se muestran cromatogramas obtenidos para el material de referencia “52 Component Indoor Air Standard”. En el Anexo 1 de este Trabajo Fin de Máster se incluye la identidad de los compuestos incluidos en el material “52 Component Indoor Air Standard” junto con su fórmula molecular, tiempo de retención y punto de ebullición. Como se puede observar, a 120 °C se produce una condensación en el tramo intermedio-final del cromatograma, la cual va disminuyendo conforme aumenta la temperatura. Se seleccionó la temperatura de 150 °C ya que no se producía la degradación de compuestos lábiles como el diclorometano ($t_R = 1,9142$ minutos) y

propanol ($t_R = 1,9947$ minutos), garantizando que no se generaba ninguna condensación que pudiera alterar el fondo del cromatograma.

4.1.2. Pre-desorción: purga

Antes de que se efectúe la desorción, el tubo que contiene la muestra debe ser purgado con un flujo de gas portador a temperatura ambiente. Esto evita la oxidación de los analitos y del sorbente, minimizando así la formación de interferentes, para poder así garantizar la calidad de los datos, además de prolongar la vida útil del tubo. De manera habitual, se pueden emplear dos tipos de purga. Su elección depende del tipo de muestra a analizar, así como del sorbente que se utilice:

- Pre-purga: el tubo de muestra es purgado con gas portador en la dirección de desorción, la cual es inversa a la dirección de muestreo. Habitualmente es recomendable que la trampa de enfoque esté en línea durante esta etapa, para retener cualquier compuesto desmesuradamente volátil, que haya sido desorbido prematuramente del tubo. De manera general, la purga previa no se recomienda para muestras con alta humedad, ya que podría ocasionarse una pérdida de los analitos más volátiles.
- Purga en seco: si se pasa gas portador a través del tubo en la dirección de muestreo, ventilando, se elimina cromatográficamente el agua y los gases permanentes de la parte posterior del tubo. Sin embargo, los analitos volátiles son arrastrados hacia el lecho sorbente, eliminando por completo el riesgo de desorción prematura.

Se evaluaron ambos tipos de purga y se seleccionó la purga en seco ya que permitía la identificación de compuestos volátiles como la acetona ($t_R = 1.7101$ minutos) y el diclorometano.

4.1.3. Parámetros de desorción del tubo

Las muestras se someten a dos etapas de desorción térmica para transferir los analitos del tubo de muestra al cromatógrafo de gases (Figura 11). Este hecho implica que los analitos se inyectan en la columna del instrumento en unos pocos cientos de microlitros de gas portador, proporcionando así una preconcentración máxima, y formas de pico satisfactorias.

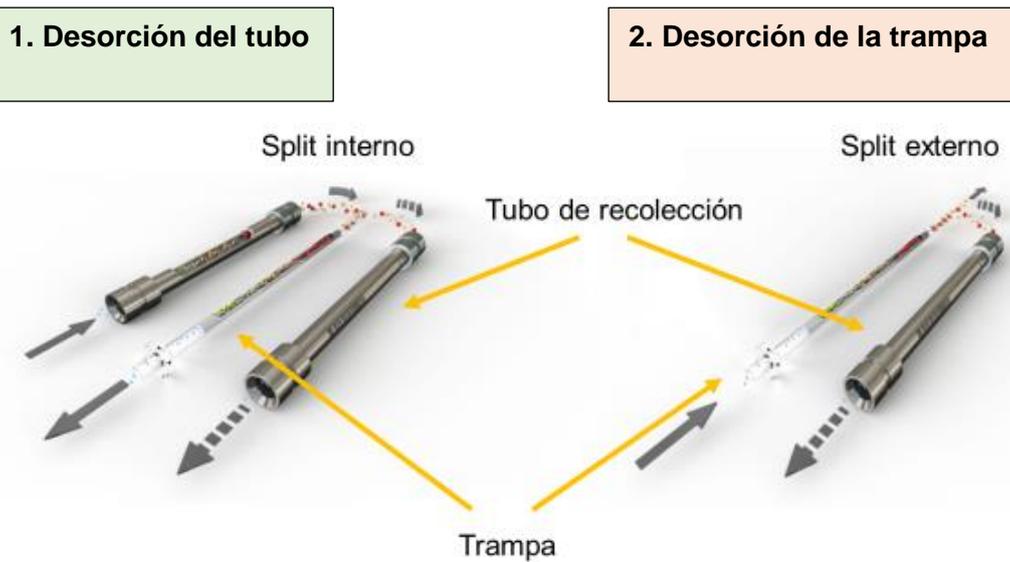


Figura 11. Esquema del proceso de desorción térmica en dos etapas en el equipo TD100-xr. Imagen adaptada.

En primer lugar, como se muestra en la Figura 11, el tubo de muestra se desorbe mediante calor y se utiliza el gas portador para transferir los analitos a la trampa. Los parámetros del método deben optimizarse para proporcionar tanto una desorción eficaz del tubo como una buena retención en la trampa.

En cuanto a la temperatura de desorción, se evaluaron temperaturas comprendidas entre 200 y 300 °C en el análisis del material de referencia de 52 compuestos volátiles en metanol. Como se muestra en la Figura 12, se observa que en todos los cromatogramas se detectan los mismos compuestos, sin diferencias significativas. Sin embargo, cuando se calcularon las áreas de los compuestos, se observó una mayor señal a 200 °C como muestran los resultados incluidos en la Figura 13. En ella se muestran las áreas de pico obtenidas para cuatro compuestos de diferente volatilidad: bromodiclorometano, alfa-pineno, tolueno y benceno D₆. La opción más recomendable es usar la temperatura más baja que sea suficiente para conseguir la completa desorción de los analitos de interés y prolongar así el tiempo de vida del sorbente junto con una disminución de los niveles de fondo.

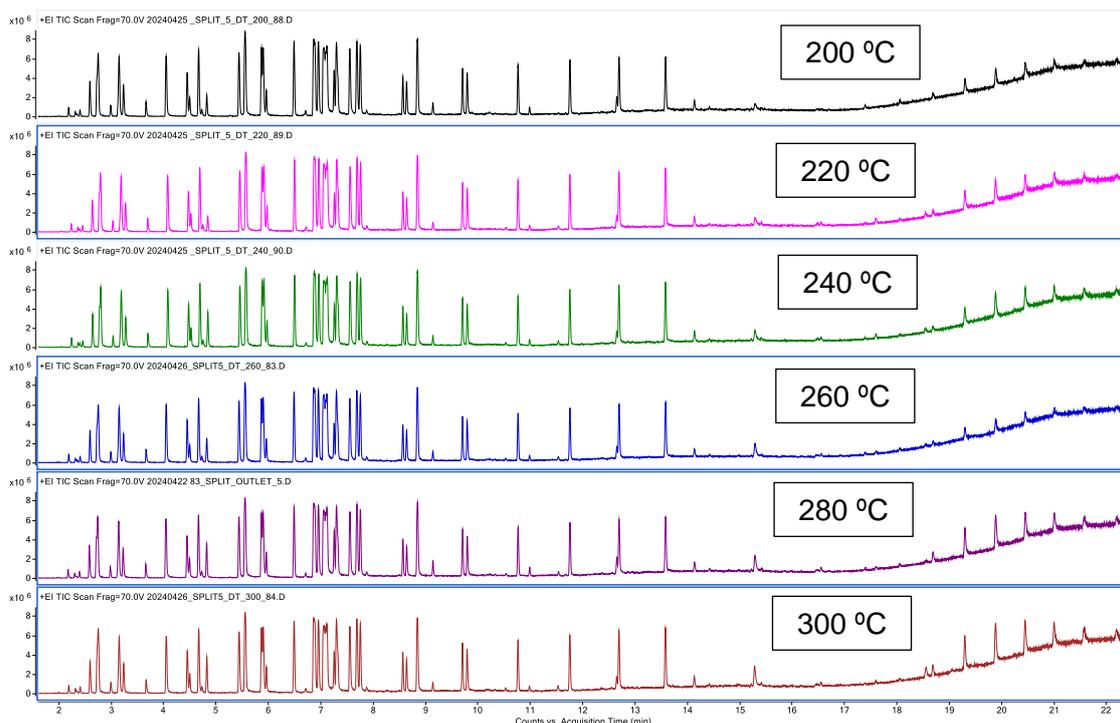


Figura 12. Cromatogramas GC-TOF del material certificado de referencia de 52 compuestos volátiles en metanol obtenidos a temperaturas de desorción, entre 200 y 300 °C, en intervalos de 20 °C.

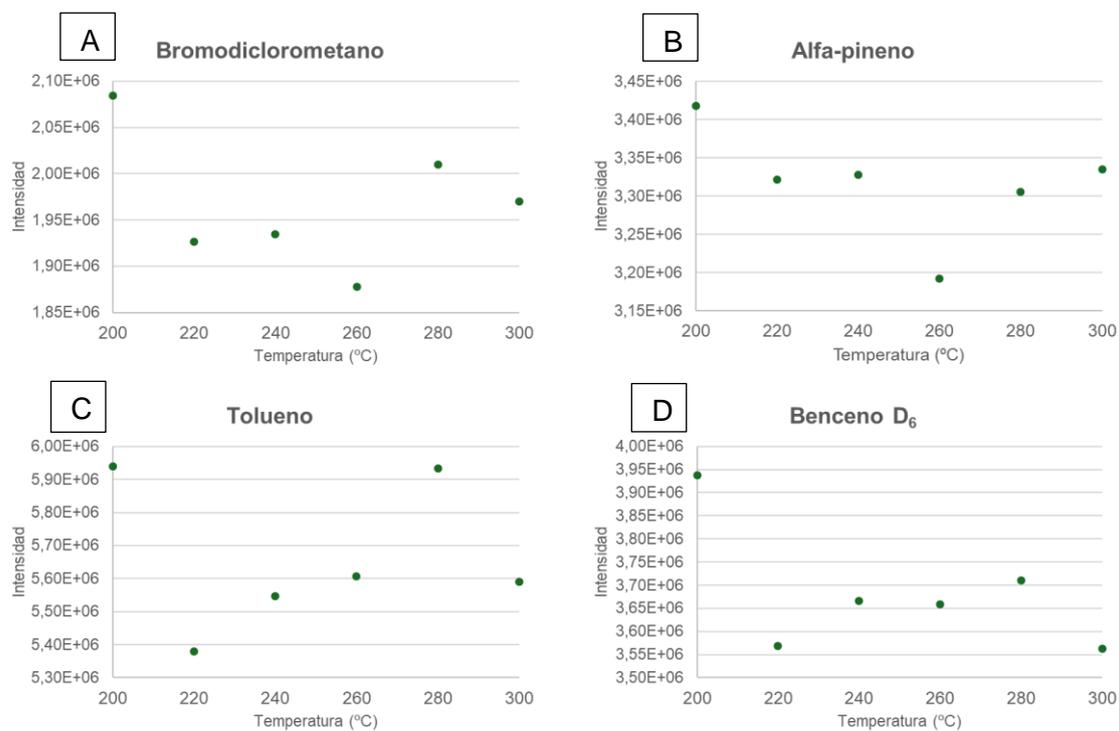


Figura 13. Áreas de pico obtenidas a distintas temperaturas del tubo adsorbente (200, 220, 240, 260, 280 y 300 °C) para los compuestos bromodichlorometano (A), alfa-pineno (B), tolueno (C) y benceno D₆ (D).

Por otro lado, fue necesario optimizar el flujo de desorción del tubo, ya que cuanto mayor sea el caudal que pasa por él, más eficaz será la desorción. Se evaluaron flujos de 10, 20, 30, 40 y 50 mL min⁻¹ en el análisis del material certificado de referencia. Como se puede observar en la Figura 14, a flujos bajos la señal del triclorometano (pico 1, tR = 2.3783 minutos) y dicloroetano (pico 2, tR = 2.6516 minutos) es mucho mayor que a flujos altos. Se observa que a flujos bajos (10 o 20 mL min⁻¹), el pico de ambas especies está bien definido, pero a medida que el flujo aumenta los picos desaparecen y dejan de ser detectables. Por lo tanto, se establece como valor óptimo 10 mL min⁻¹, ya que se obtiene la mayor señal, deduciendo que se favorece el atrapamiento de los compuestos volátiles en la trampa.

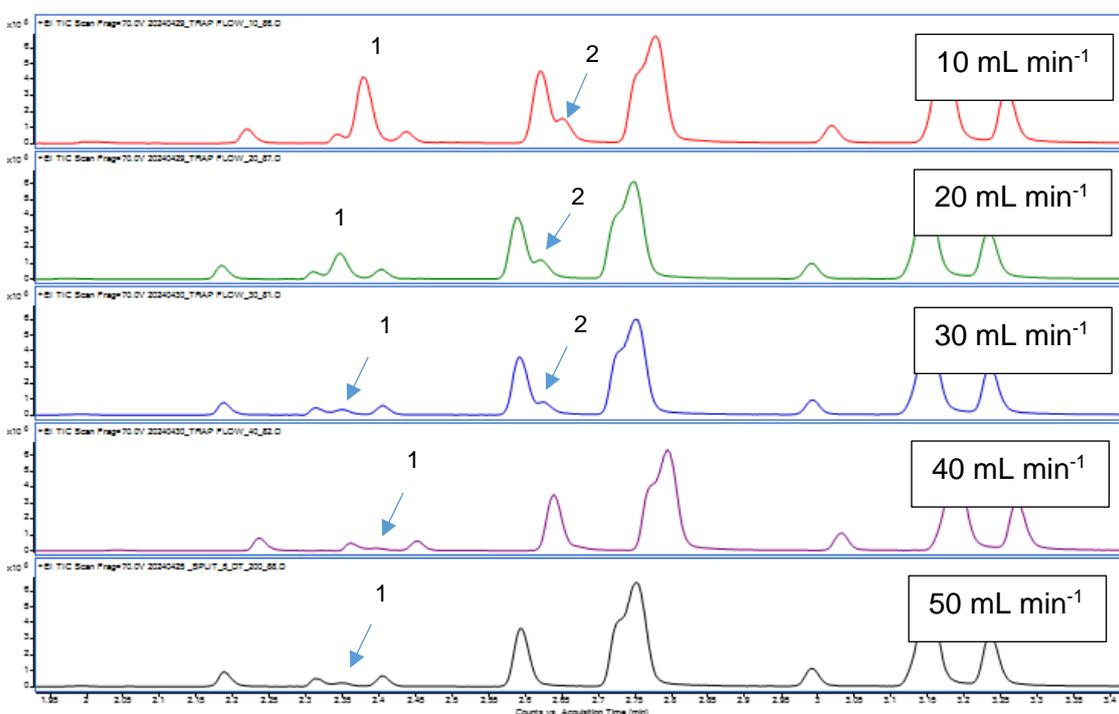


Figura 14. Cromatogramas GC-TOF del material certificado de referencia ampliados en la zona de elución del triclorometano y dicloroetano obtenidos a diferentes flujos de desorción.

Análogamente, se evaluó el tiempo de desorción del tubo a 8, 9 y 10 minutos y se seleccionaron 10 minutos como valor óptimo ya que proporcionaba una mayor señal para todos los compuestos incluidos en el patrón de 52 compuestos volátiles.

4.1.4. Parámetros de la trampa: flujo de gas portador en dirección de muestreo, temperatura de atrapamiento, temperatura de desorción y tiempo de desorción

La trampa se purga con un flujo de gas portador en la dirección del muestreo para poder eliminar cualquier resto de oxígeno, disolvente o agua, antes de ser calentada durante el proceso de desorción. Se evaluaron flujos de 30, 40 y 50 mL min⁻¹ en el análisis del

patrón de 52 compuestos. En la Figura 15 se observa como a flujos bajos, la parte final del cromatograma tiene muchos más picos debidos a interferentes, en comparación con los flujos altos.

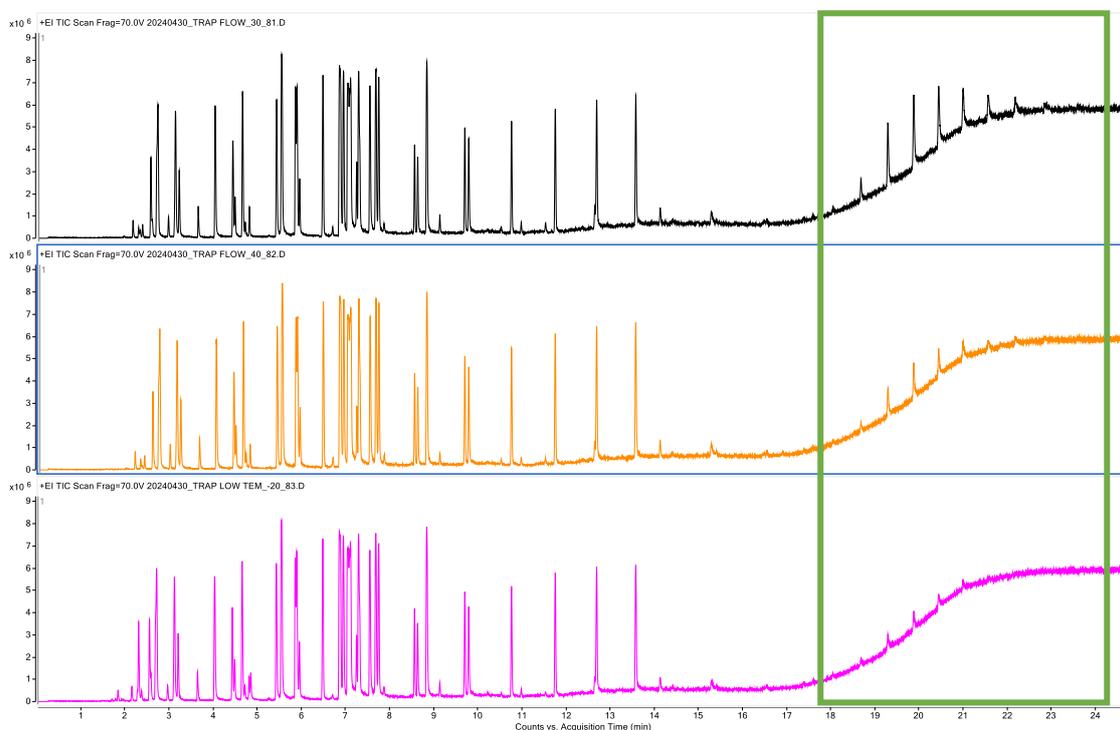


Figura 15. Cromatogramas GC-TOF del patrón de 52 compuestos obtenido a flujos de la trampa de 30 mL min⁻¹ (negro), 40 mL min⁻¹ (naranja) y 50 mL min⁻¹ (rosa).

Como se muestra en la Figura 16, utilizando un flujo de 50 mL min⁻¹ se consiguen identificar los compuestos más volátiles, como son la acetona (tR = 1.7101 minutos), diclorometano (tR = 1.8469 minutos) y propanol (tR = 1.9270 minutos), que se señalan en el recuadro verde de la Figura 16. Además, las señales del triclorometano (2, tR = 2.3135 minutos) y del dicloroetano (3, tR = 2.5941 minutos) son mayores a este flujo.

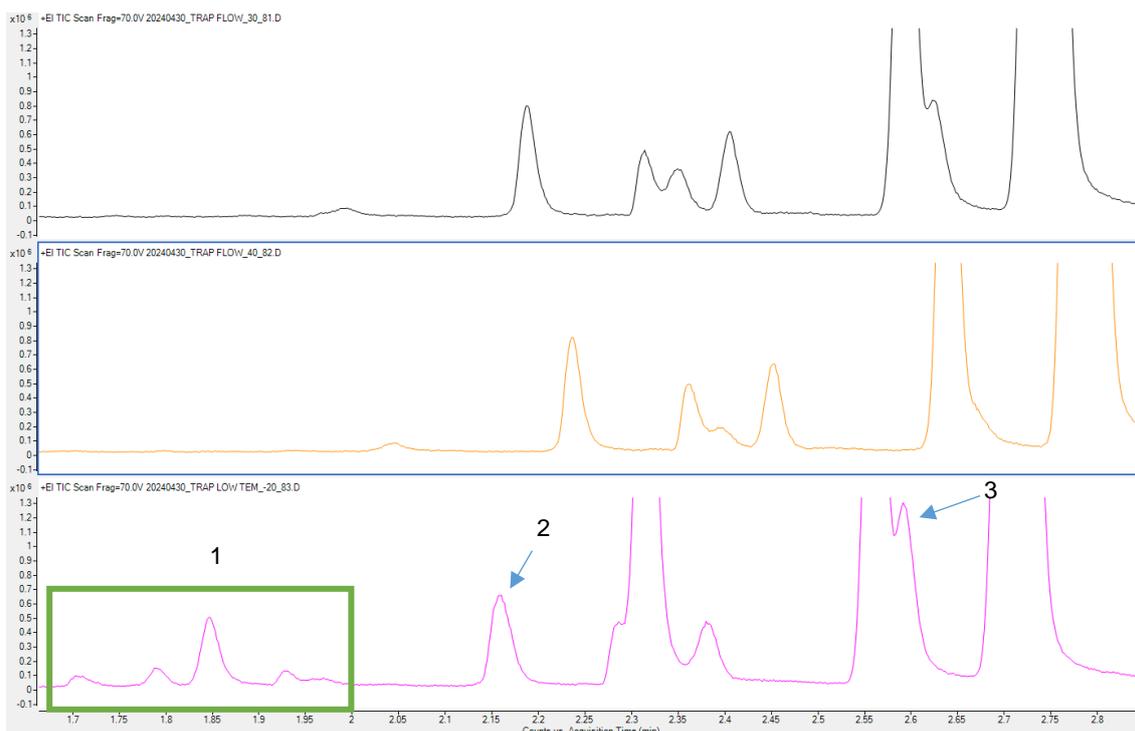


Figura 16. Ampliación de los 3 primeros minutos de los cromatogramas GC-TOF del patrón de 52 compuestos obtenido a flujos de la trampa de 30 mL min⁻¹ (negro), 40 mL min⁻¹ (naranja) y 50 mL min⁻¹ (rosa). En el cromatograma a flujo de 50 mL min⁻¹, se muestran la acetona, el diclorometano y el propanol, señalados como (1), además del triclorometano (2) y el dicloroetano (3).

Con el fin de establecer la temperatura óptima de atrapamiento, se llevó a cabo el análisis en un rango de temperaturas entre -30 °C y 25 °C. Para ello se evaluó la pérdida de los compuestos más volátiles a altas temperaturas, junto con las interferencias del agua o el disolvente a bajas temperaturas. Como se puede observar en los cromatogramas de la Figura 17, a -30 °C se detectaron compuestos volátiles como la acetona (1, tR = 1.7539 minutos) y propanol (2, tR = 1.9770 minutos). A -20 °C además se detectaba con buena señal el diclorometano (3, tR = 1.8469 minutos). No obstante, a partir de 0 °C no se detectaba el diclorometano; y a partir de 10 °C tampoco la acetona ni el propanol. Por otro lado, la señal del triclorometano (4, tR = 2.3135 minutos) se detecta a 10 °C, pero a 20 °C no es detectada, por lo que su señal disminuye al aumentar la temperatura. Por lo tanto, la temperatura óptima se estableció a -20 °C, porque permitía retener los compuestos más volátiles y conseguir la mayor señal para el diclorometano.

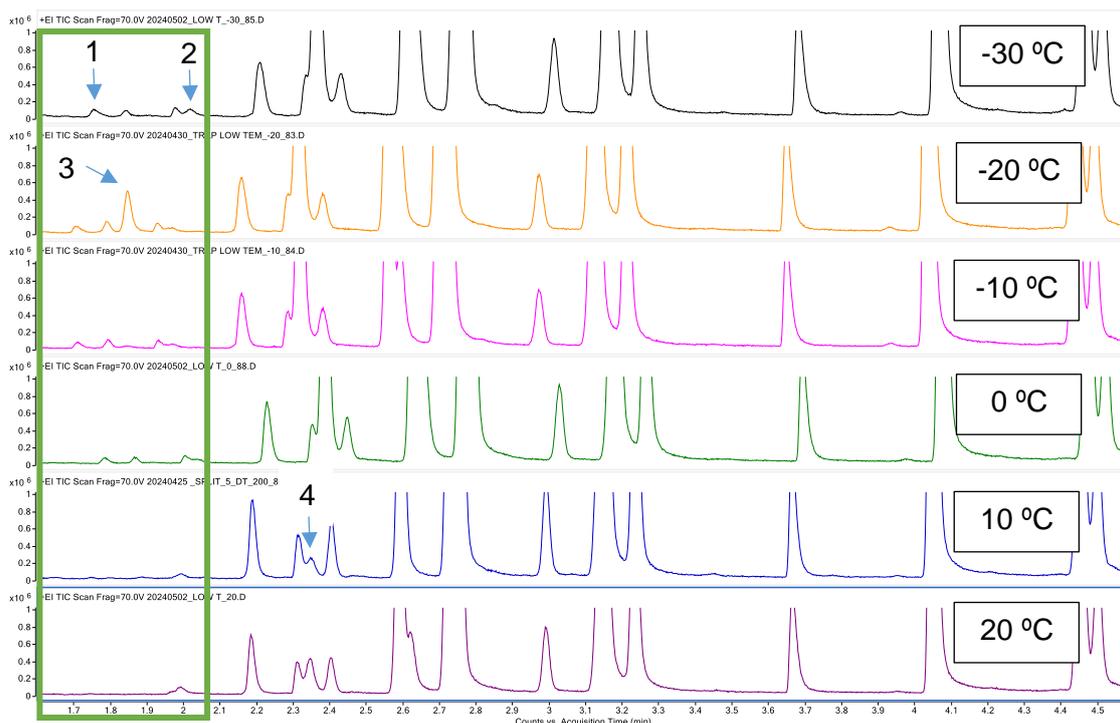


Figura 17. Cromatogramas GC-TOF correspondientes a la optimización de la temperatura de atrapamiento a -30 °C (negro), -20 °C (naranja), -10 °C (rosa), 0°C (verde), 10 °C (azul) y 20 °C (morado), donde se pueden observar los cambios en los picos cromatográficos de acetona (1), propanol (2), diclorometano (3) y triclorometano (4).

Por otro lado, la temperatura de desorción de la trampa debía ser optimizada para proporcionar la transferencia de todos los analitos lo más rápidamente posible a la columna cromatográfica del GC-TOF. Para lograr esto, la trampa se calentó con una rampa de temperatura de 100 °C s⁻¹, para alcanzar temperaturas típicas entre 250 y 350 °C en función del sorbente y los analitos de interés. Debido a que los tubos sorbentes eran C2-AAXX-5149 Tenax TA/Carbograph 5TD y admiten una temperatura máxima entre 350 y 400 °C, se evaluaron temperaturas en todo el rango (250, 270, 290, 310, 330 y 350 °C), identificándose el mismo número de compuestos a todas las temperaturas. Se seleccionó 290 °C ya que fue la temperatura a la cual se obtenía menor fondo y menor de señal de compuestos interferentes.

Finalmente, el último parámetro que se evaluó fueron los tiempos de desorción de la trampa (2, 4, 6, 8 y 10 minutos). Con un tiempo de 2 minutos no solo se obtenía un aumento de la señal de todos los compuestos, si no que se reducía enormemente el tiempo de análisis, permitiendo analizar un mayor número de muestras en un menor tiempo.

4.2. Evaluación del sistema de carga del patrón interno y normalización de la señal

Con el fin de evaluar la variabilidad del sistema de carga de disoluciones (CSLR) y optimizar la normalización de la señal con patrones internos, se incorporó a los tubos adsorbentes a través del CSLR la disolución de 52 VOCs y una mezcla de 9 estándares internos que incluían pentafluorobenceno, 1,2-dicloroetano D₄, benceno D₆, 1,4-difluorobenceno, tolueno D₈, clorobenceno D₅, fenol 1 ¹³C, 1,4-diclorobenceno y hexadecano D₃₄. Se realizaron 5 réplicas independientes para evaluar la variabilidad de los resultados.

La normalización se llevó a cabo dividiendo el área de cada compuesto entre el área de los patrones internos y se calculó la desviación estándar relativa (RSD) para cada compuesto a partir de las 5 réplicas analizadas del patrón de 52 compuestos. Para la visualización de los resultados, se representó en la Figura 18 la RSD de cada compuesto a lo largo del tiempo de retención (RT) del cromatograma, incluyendo el valor sin normalizar (rojo) y el valor normalizado (verde) con cada uno de los 9 patrones internos utilizados. El tiempo de retención del patrón interno utilizado en cada caso se marcó con una «x» en color azul oscuro en cada una de las gráficas de la Figura 18. Cabe destacar que cuando no se normalizaron las áreas, la RSD obtenida fue inferior al 9%.

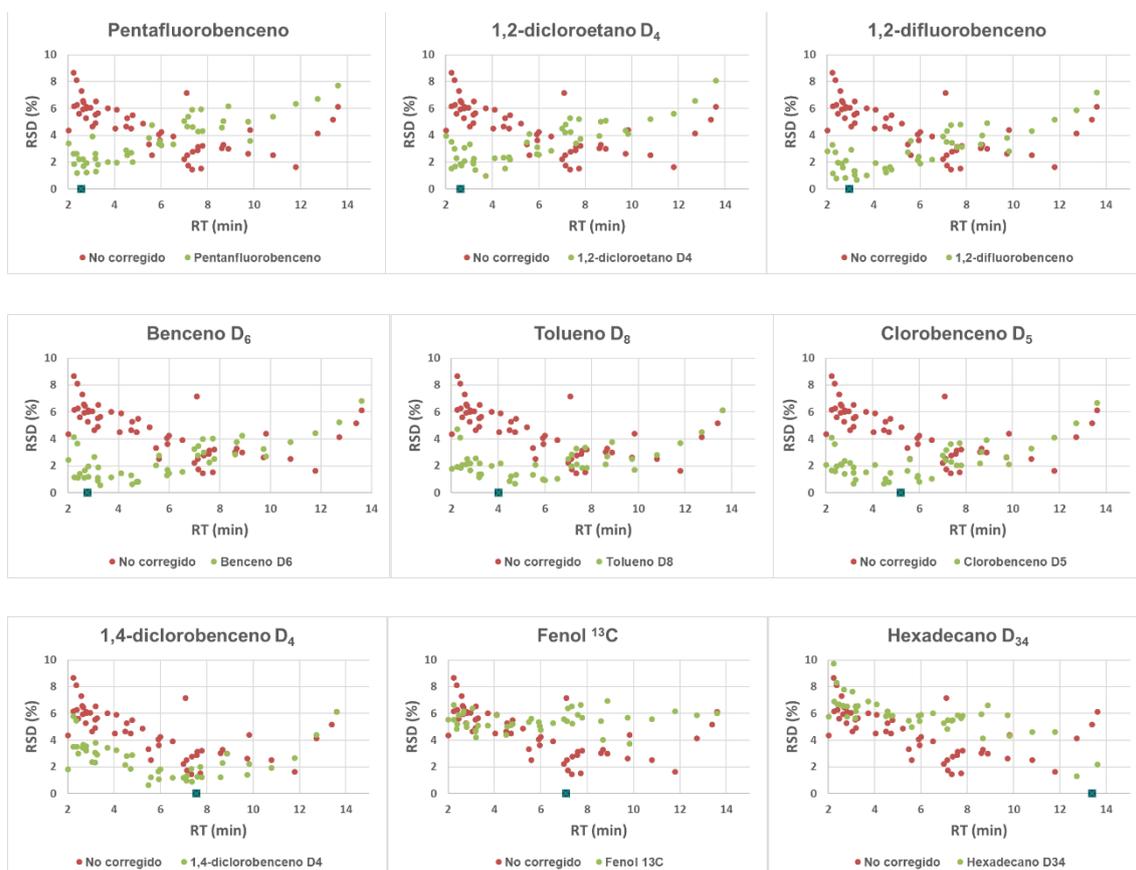


Figura 18. RSD ($n=5$) de 44 compuestos a lo largo del tiempo de retención (RT) cuando no se normaliza la señal (rojo) y cuando se normaliza (verde) con pentafluorobenceno, 1,2-dicloroetano D_4 , 1,4-difluorobenceno, benceno D_6 , tolueno D_8 , clorobenceno D_5 , 1,4-diclorobenceno D_4 , fenol $1^{13}C$ y hexadecano D_{34} . El tiempo de retención del patrón interno se representa en la gráfica con una "x" de color azul.

En la Figura 18 se puede observar como con la normalización de la señal con el pentafluorobenceno ($tR = 2.56$ minutos), el dicloroetano D_4 ($tR = 2.61$ minutos) y el difluorobenceno ($tR = 2.95$ minutos) consigue disminuir la RSD de todos los compuestos con $tR < 7$ minutos en comparación con los valores sin normalizar. Por tanto, se puede concluir que estos tres patrones internos son óptimos para la normalización en una ventana de tiempo de 2 a 7 minutos.

Por otro lado, tanto el benceno D_6 ($tR = 2.76$ minutos), tolueno D_8 ($tR = 4.02$ minutos), clorobenceno D_5 ($tR = 5.21$ minutos) y el diclorobenceno D_4 ($tR = 7.55$ minutos) disminuyeron las RSD de un mayor número de compuestos. Es importante mencionar que el diclorobenceno disminuye la RSD de todos los compuestos en una ventana de tiempo de 2 a 11 minutos.

Por último, con el fenol ^{13}C ($tR = 7.07$ minutos) no se consiguió disminuir la RSD de ninguno de los compuestos y el hexadecano, que era el patrón interno de mayor tiempo de retención ($tR = 13.37$ minutos), sólo resultaba óptimo para dos compuestos próximos a su tiempo de retención.

En definitiva, no todos los patrones internos resultaron ser óptimos para la normalización de la señal. En la Tabla 1 se resume el número de compuestos que cada patrón interno logró disminuir la RSD respecto a su valor sin normalizar. Dados los resultados, se descartaron el empleo del fenol ^{13}C y del dicloroetano D_4 .

Tabla 1. Relación entre el patrón interno empleado y el número de compuestos cuya RSD disminuyó gracias a su normalización frente al patrón interno.

Patrón interno	Nº de compuestos
Pentafluorobenceno	3
1,2-dicloroetano D_4	1
Benceno D_6	7
1,4-difluorobenceno	5
Tolueno D_8	5
Clorobenceno D_5	6
Fenol ^{13}C	0
1,4-diclorobenceno D_4	16
Hexadecano D_{34}	3

En la Figura 19 se representa la RSD de cada compuesto sin normalizar (rosa) y cuando se normaliza con el patrón interno óptimo, es decir, aquel que consigue disminuir en mayor grado su RSD respecto al valor sin normalizar. Se puede concluir que la reproducibilidad del sistema de carga de disoluciones mejora cuando se normaliza la señal de los compuestos con su patrón interno óptimo, disminuyendo la RSD a valores inferiores al 3 %.

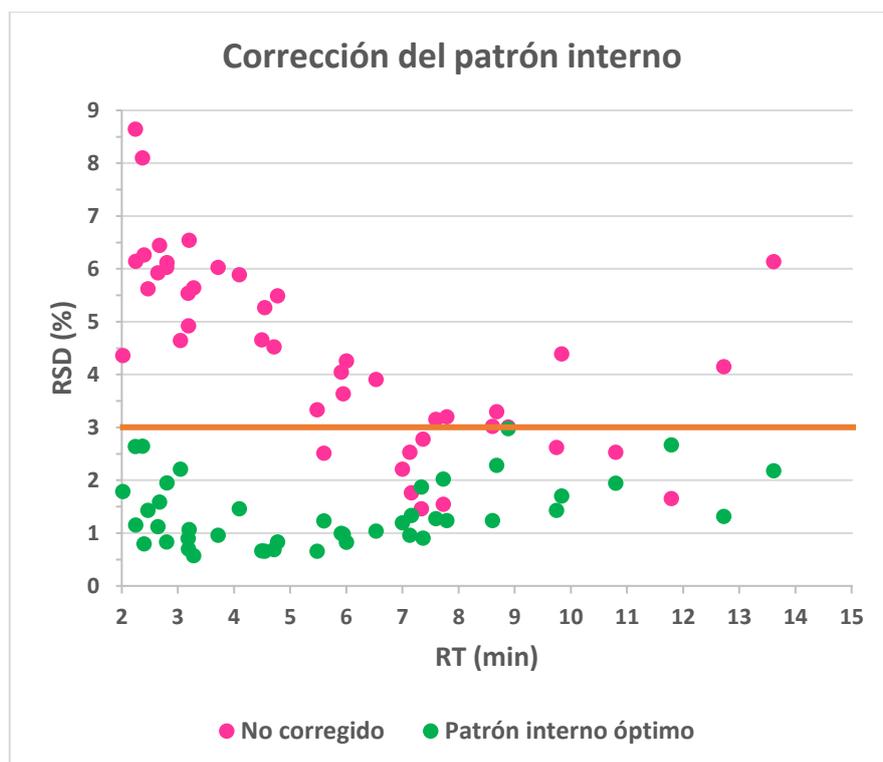


Figura 19. RSD calculada a partir de $n=5$ inyecciones de un patrón de 44 compuestos a lo largo del tiempo de retención (RT) cuando no se normaliza la señal (rosa) y cuando se normaliza (verde) con su patrón interno óptimo.

4.3. Estudio de la linealidad y la variabilidad en el análisis de muestras de aire exhalado

Se estudió la variación de la señal del método de dos maneras distintas. En primer lugar, se analizó el aire exhalado de un mismo individuo para comprobar la linealidad del proceso de desorción. Se estudió si con un mayor número de exhalaciones consecutivas en el mismo tubo adsorbente, se obtenía un aumento de la señal de los analitos presentes en el aliento. De esta forma, se realizaron cuatro medidas diferentes, pero recogiendo el aire exhalado siempre con el mismo tubo adsorbente. En la primera, se recogería una única exhalación; en la segunda tres exhalaciones; en la tercera seis; y en la cuarta y última, nueve exhalaciones. Los patrones internos se introdujeron previamente a la toma de muestra. Entre cada exhalación e introducción de muestra en

el tubo adsorbente, transcurrieron 10 minutos para otorgar un descanso al individuo y que la tarea no requiriese mucho esfuerzo y desgaste.

Los datos que se obtuvieron (Figura 20) reflejaron que efectivamente, como se había previsto, existía una pequeña relación entre el aumento de la señal y el número de exhalaciones efectuadas. El pico de mayor intensidad corresponde con nueve exhalaciones, y decrece de manera consecutiva, siendo el menos intenso el de una única exhalación. Se observa que existe una relación lineal directa entre el número de exhalaciones y la intensidad del pico, con un buen coeficiente de correlación (R^2) para la recta obtenida.

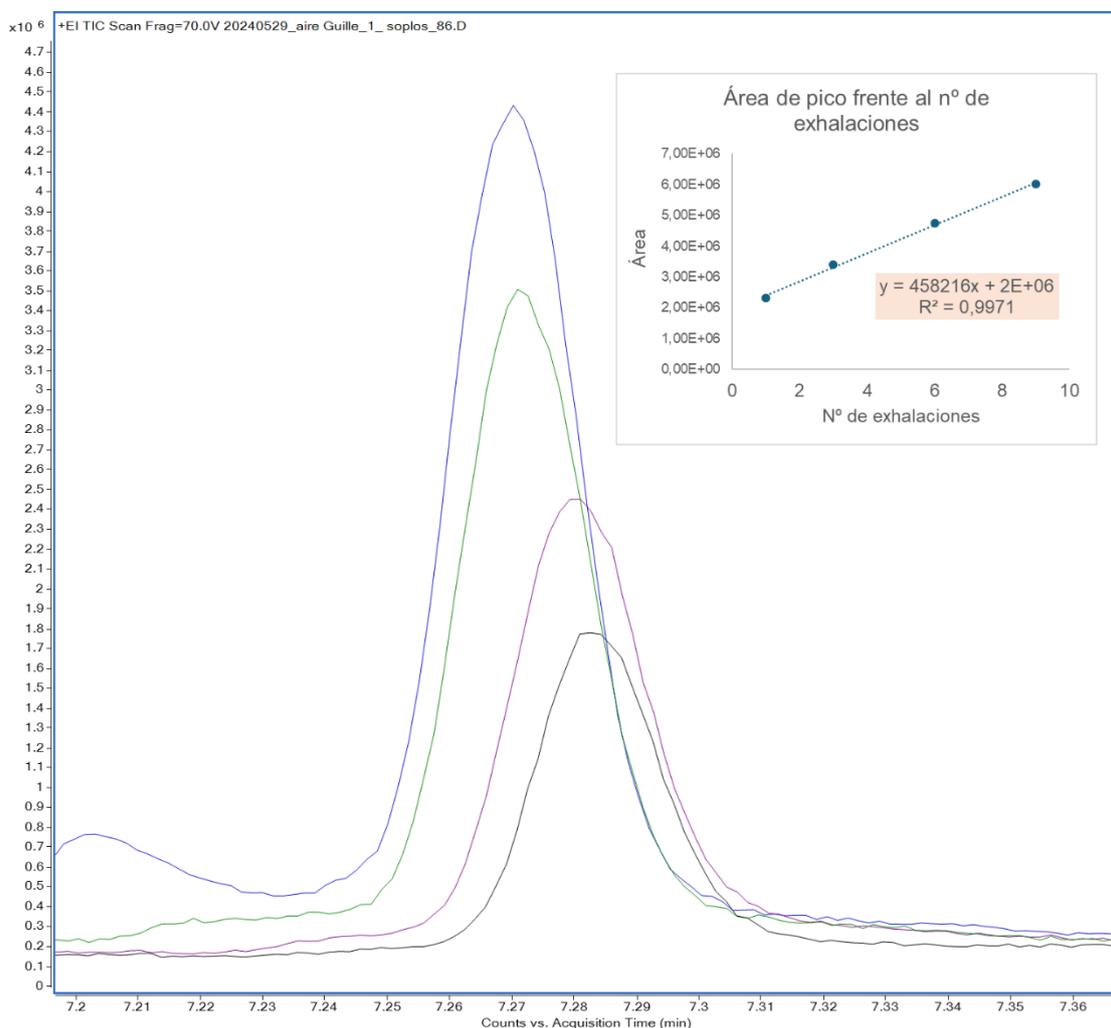


Figura 20. Áreas del pico para el limoneno obtenido con un número distinto de exhalaciones a través del tubo de adsorción.

Por otra parte, se evaluó la señal cuando se trabaja con el mismo individuo, soplando seis veces por tubo, en cinco tubos de adsorción diferentes. De esta forma, se evaluaría

la reproducibilidad del proceso obtenida al hacer medidas consecutivas en una misma persona.

Se identificaron 93 compuestos comunes en las cinco réplicas y se evaluaron distintos enfoques de normalización de la señal. El primero, fue normalizando con la suma total del área de los compuestos. Después, se normalizó frente al área total del cromatograma (TIC) y finalmente con los 7 patrones internos. En la Figura 21 se muestra un diagrama de cajas y bigotes correspondiente a la RSD obtenida con cada modo de normalización. Como se puede observar, en el análisis de las muestras de aire exhalado la RSD de los analitos sin normalizar se incrementó desde el 3% obtenido en el apartado 4.2 hasta el 30 %.

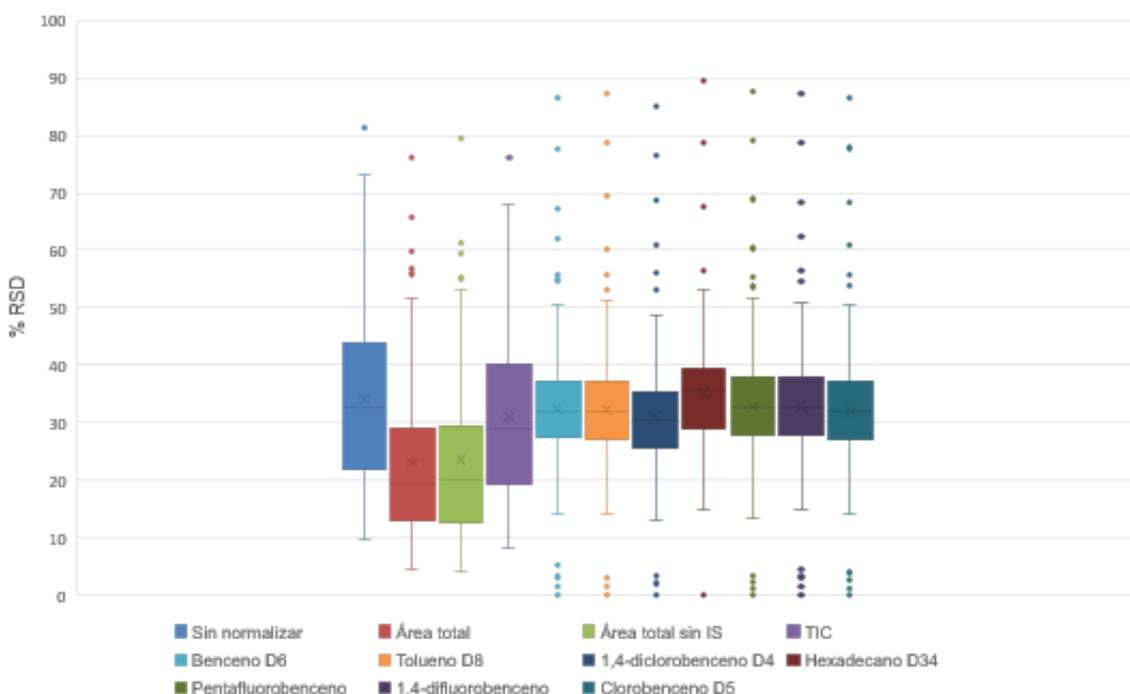


Figura 21. Representación del porcentaje de RSD frente la estrategia de normalización empleada en el estudio de la reproducibilidad del método con muestras reales.

Como se aprecia en la Figura 21, la mejor estrategia de normalización resultó ser la obtenida a través del área total. En la tabla 2, se recogen también los datos acerca de los promedios de la RSD del área, así como el número de compuestos con un RSD del área menor al 30 %.

Tabla 2. Compuestos identificados con un RSD para el área menor a un 30 %, así como el promedio de la RSD para los diferentes métodos de normalización empleados.

Tipo de normalización	Número de compuestos con RSD del área menor al 30 %	Promedio de RSD (%)
Sin normalizar	38	34
Normalización por área total	71	23
Normalización por área total sin IS	65	24
Normalización frente al TIC	50	31
Benceno D6	34	32
Tolueno D8	32	32
Hexadecano D34	26	35
Pentafluorobenceno	32	32
Difluorobenceno	32	32
Clorobenceno D5	35	32
1,4-Diclorobenceno D4	43	31

Los datos recogidos en la Tabla 2 reflejan que, sin realizar ningún tipo de normalización, 38 de los 93 compuestos comunes, el 41 %, presenta una RSD por debajo del 30 %. Cuando se normaliza frente al TIC, el número aumenta hasta 50, suponiendo el 54 % de los analitos. Sin embargo, los mejores resultados de normalización se obtienen cuando la normalización se realiza frente al área total, con 71 de los 93 compuestos con una RSD menor al 30 %.

En cambio, cuando la normalización se realiza a través de los patrones internos, los resultados no son tan positivos, encontrándose el 1,4-diclorobenceno D₄ como el estándar interno que mejores cifras ofrece, con un 46 % de compuestos con RSD menor al 30 %. Teniendo en cuenta que la reproducibilidad del CSLR para los 44 compuestos de estudio, realizando una normalización de la señal con patrones internos eran iguales o inferiores al 3 %, está claro que existe un factor externo que produce un abrupto incremento en la desviación estándar relativa. Dicho aumento en este estudio puede deberse a que la carga de estándares internos en el tubo adsorbente se realizó antes de la toma de muestra, y por ello sería conveniente evaluar en trabajos futuros la

reproducibilidad con normalización de patrones internos adsorbidos después de la toma de muestra.

4.4. Análisis estadístico de los perfiles metabólicos en diferentes individuos

4.4.1. Análisis de datos

Se evaluaron los perfiles metabólicos de tres individuos diferentes que no padeciesen cáncer de pulmón. Para ello, se muestreó el aire exhalado soplando seis veces en tres tubos adsorbentes distintos, con intervalos de 10 minutos entre cada exhalación para proporcionar un descanso.

Las muestras fueron analizadas en orden aleatorio mediante el sistema de desorción térmica acoplado al GC-QTOF. El software MassHunter Qualitative Analysis (versión 10.0, Agilent, CA, EE. UU.) permitió visualizar los cromatogramas de forma previa al tratamiento de los datos. Los cromatogramas obtenidos se transformaron a formato SureMass a través del software MassHunter Unknowns Analysis (versión 11.0, Agilent, CA, EE.UU.). A continuación, los datos SureMass se sometieron a la detección de picos, deconvolución y búsqueda en librerías de espectros (NIST20.L, FIEHN-2013 y W12N20_MAIN). Posteriormente, se creó una base de datos de los compuestos de interés con el software Library Editor (versión 11.0, Agilent, CA, EE. UU.). A partir de dicha base de datos, se creó un método de integración de picos cromatográficos en el software MassHunter Quantitative Analysis for Q-TOF (versión 10.2, Agilent, CA, EE. UU.). La matriz de datos se introdujo en el software Metaboanalyst 6.0, llevando a cabo la normalización por suma de área total y el escalado de Pareto. Finalmente, se ejecutó el análisis estadístico multivariante (análisis de componentes principales, PCA, y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, PLSDA), visualizando los datos por medio de un mapa de calor.

4.4.2. MassHunter Qualitative Analysis: visualización

Con el fin de evaluar cualitativamente las características metabólicas que diferencian a los individuos, los cromatogramas obtenidos se visualizaron y estudiaron previamente. En la Figura 22 se observa que aparentemente existen 4 características diferenciadoras de cada perfil metabólico. La identificación de estos compuestos se realizaría más adelante, gracias al software MassHunter Unknowns Analysis.

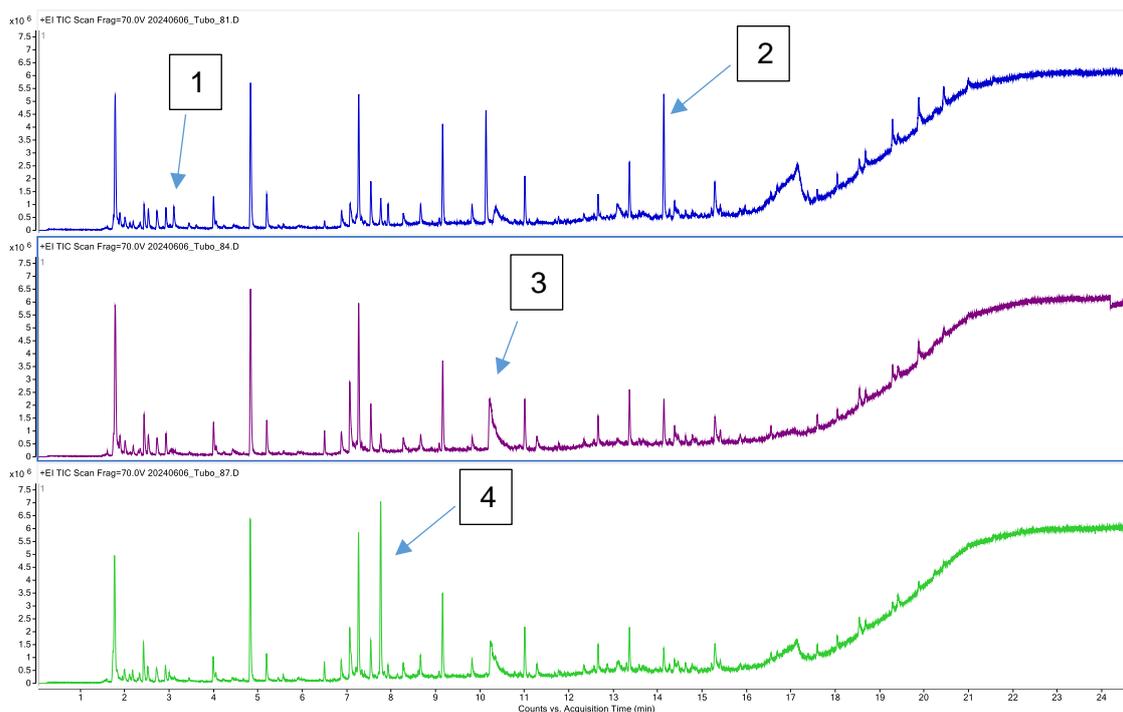


Figura 22. Cromatogramas GC-TOF de muestras de aire exhalado de tres individuos diferentes en condiciones de muestreo idénticas, pero con una secuenciación en el equipo de desorción térmica aleatoria. Se muestran 4 picos cromatográficos que difieren cualitativamente entre perfiles.

4.4.3. MassHunter Unknowns Analysis: deconvolución

El software MassHunter Unknowns Analysis de Agilent utiliza un proceso de deconvolución que ayuda a identificar con una determinada confianza los compuestos incluso si están ocultos por debajo de compuestos de matriz coeluyentes, como se muestra en la Figura 23. Este algoritmo identifica compuestos en los datos de GC/MS y crea un espectro de masas limpio para cada compuesto. La figura muestra además los resultados de la deconvolución de datos y la identificación de compuestos por comparación de los espectros experimentales con los espectros de las diferentes librerías oficiales, empleando el software MassHunter Unknowns Analysis. La identificación de compuestos se llevó a cabo con un factor de coincidencia mayor o igual a 80. En las 9 muestras se identificaron una media de 145 ± 3 compuestos. Posteriormente, se revisaron los datos y se eliminaron compuestos con señales no significativas del orden de 10^3 y el número de compuestos de interés descendió hasta 104 ± 5 .

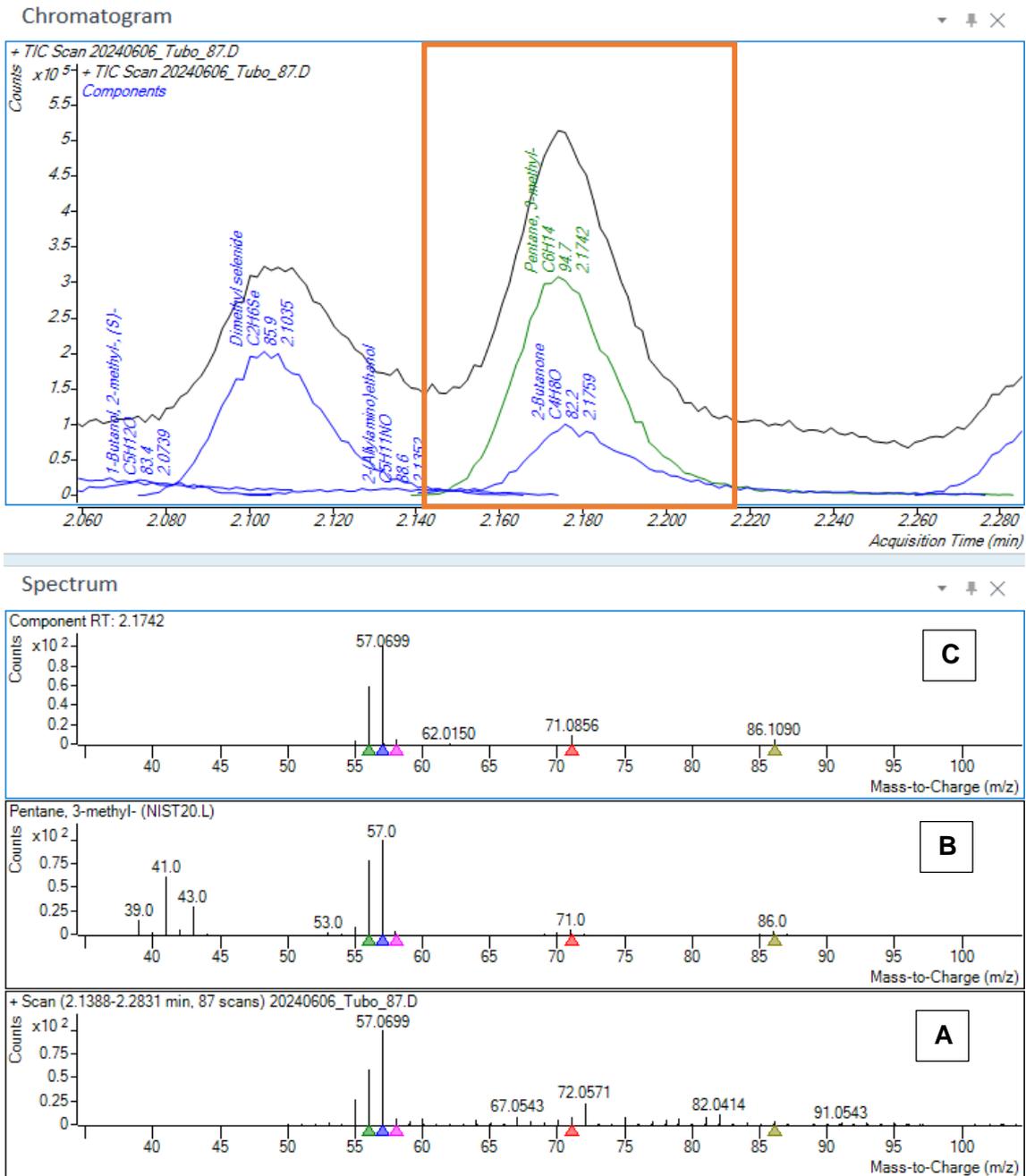


Figura 23. El software MassHunter Unknowns Analysis utiliza un algoritmo de deconvolución para separar dos compuestos que coeluyen. El espectro sin deconvolucionar (A), el espectro de la librería (B) y el espectro experimental deconvolucionado del compuesto (C) se muestran en la misma ventana para facilitar la revisión de datos.

4.4.4. Libray Editor y MassHunter Quantitative Analysis for Q-TOF

La tabla de compuestos identificados se exportó al Software Library Editor, el cual permitió crear una base de datos de masa exacta, donde se incluiría el nombre, fórmula, espectro y tiempo de retención de los compuestos, tal y como se muestra en la Figura 24.

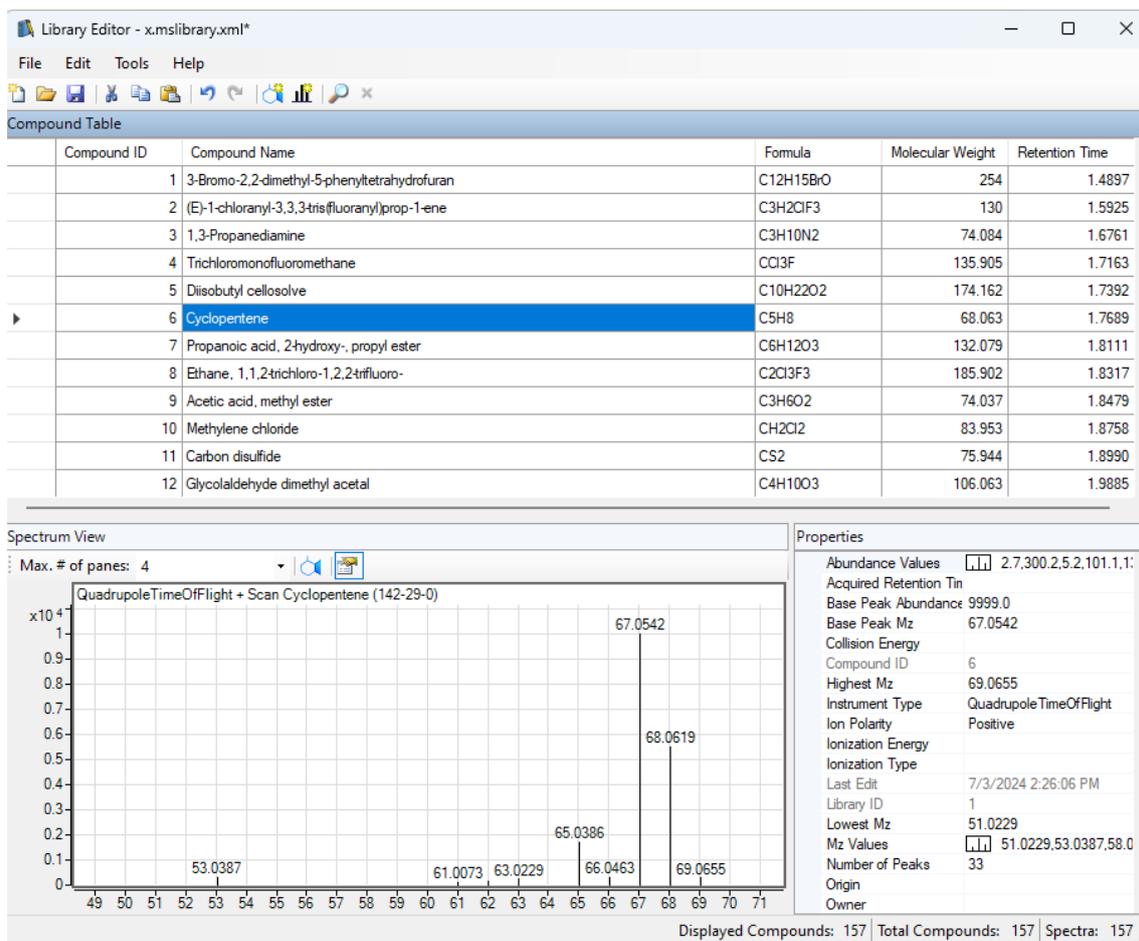


Figura 24. El software Library Editor permite la creación de una base de datos de compuestos identificados, en la que se incluyen los espectros experimentales, así como los tiempos de retención de las especies.

Una vez obtenida la base de datos, con el software MassHunter Quantitative Analysis de Agilent, se creó un método para la detección e integración de picos cromatográficos, empleando los parámetros de la tabla 3:

Tabla 3. Parámetros del método creado para el software MassHunter Quantitative Analysis for Q-TOF.

Parámetro	Descripción
Ion	Ponderado
Tiempo de retención (min)	± 0,2
m/z (ppm)	± 20

De esta forma, se generó una tabla de las áreas de los 109 compuestos de interés, verificando la integración y el espectro de cada uno de ellos.

4.4.5. Metaboanalyst 6.0

El software libre *Metaboanalyst*, es un conjunto de herramientas en línea para el análisis e interpretación de datos metabólicos que ofrece una gran variedad de métodos de análisis adaptados para datos metabólicos, como son el procesamiento, la normalización, el análisis estadístico multivariante o la anotación de datos. Es por ello que se utilizó este software para realizar el correspondiente análisis estadístico de las muestras. Tras la integración de picos cromatográficos, se generó una matriz de datos compuesta por 9 muestras diferentes, 116 características metabólicas y 3 grupos. No se detectaron valores perdidos. La normalización de los datos se realizó a través de las sumas de áreas totales y escalado de Pareto (centrado en la media y dividido por la raíz cuadrada de la desviación típica de cada variable), para transformar la matriz de datos en una distribución de tipo más gaussiano. La normalización, así como el escalado de los datos, se encuentran recogidos en la Figura 25:

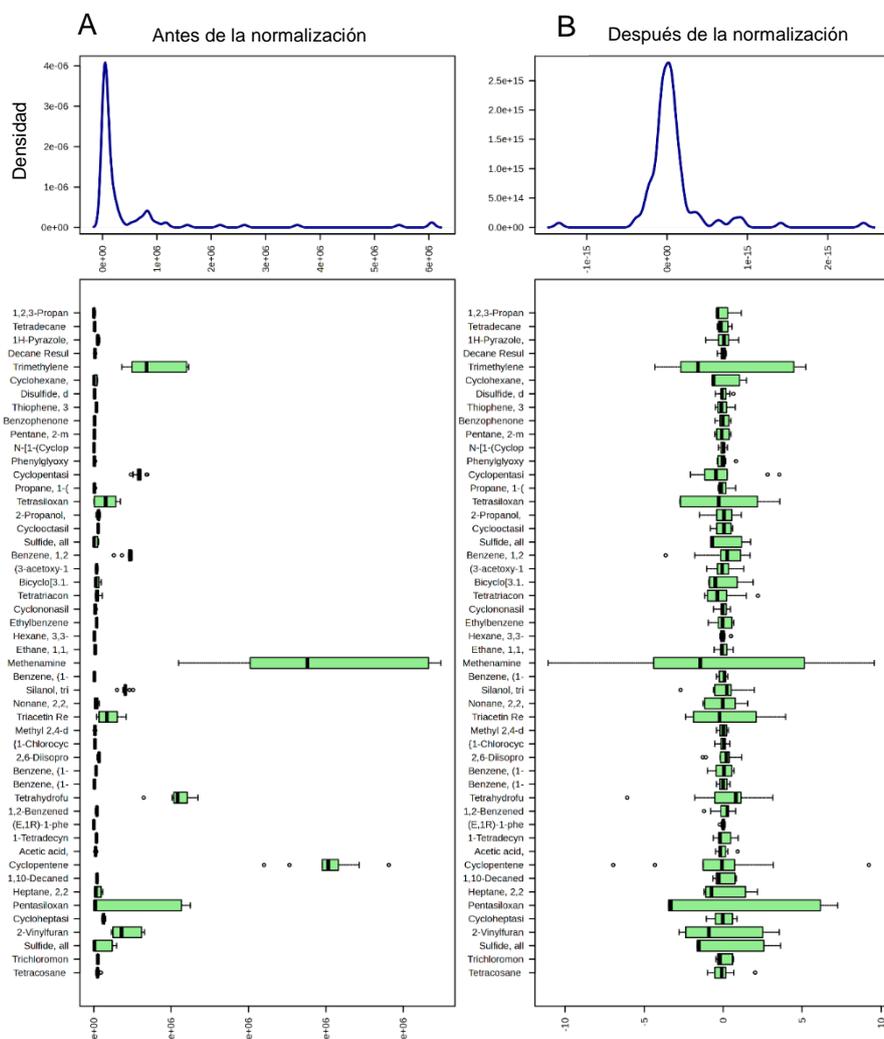


Figura 25. Normalización y escalado de la matriz de datos obtenida mediante el software *Metaboanalyst*. Datos sin normalizar (A) vs normalizados (B).

Se realizó un análisis multivariante para identificar las variables que discriminaban entre los diferentes perfiles metabólicos, combinando PCA con PLS-DA. Los metabolitos diferenciales se examinaron con los criterios $VIP\ score > 1$.

El análisis estadístico multivariante se aplicó a la matriz de datos que contiene las 116 áreas de las características metabólicas de los triplicados de tres individuos diferentes, y fue llevado a cabo nuevamente con el software Metaboanalyst 6.0. El algoritmo no supervisado de PCA permite extraer la información más útil de un gran conjunto de datos reduciendo su dimensionalidad, dando lugar a un modelo de clasificación. La Figura 26 muestra la gráfica PCA obtenida con la matriz de datos, donde los tres primeros componentes principales (PC) explican el 82,1 % de la varianza de los datos. La observación más significativa es la agrupación de las tres réplicas de cada individuo explicado a través del PC1 y PC2. Cabe destacar que esta separación fue independiente de factores como la edad o hábitos.

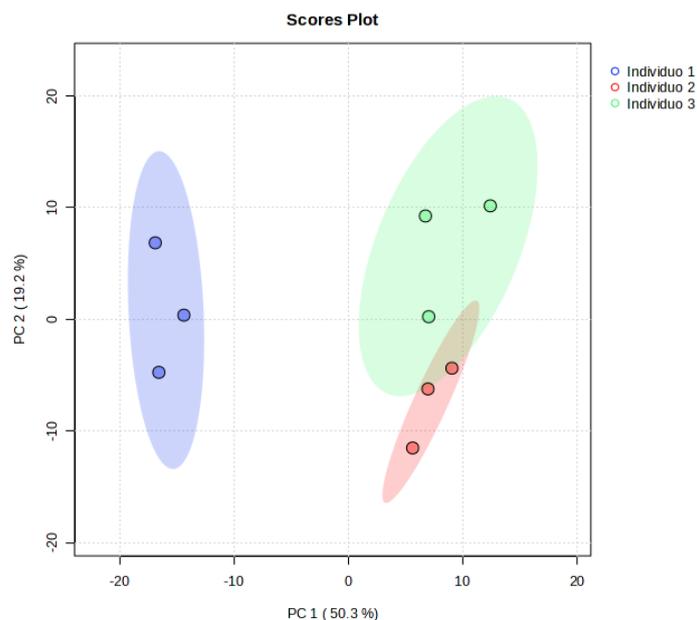


Figura 26. Gráfica del análisis de Componentes Principales (PCA) del triplicado de muestras de aire exhalado de tres individuos.

El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales es un método de clasificación supervisado, el cual se muestra en la Figura 27. En él se puede observar un agrupamiento más estrecho de las réplicas de cada individuo. Por otro lado, tanto el PC1 (varianza 49,4 %) como el PC2 (varianza 17,6%) permiten distinguir entre los tres perfiles metabólicos.

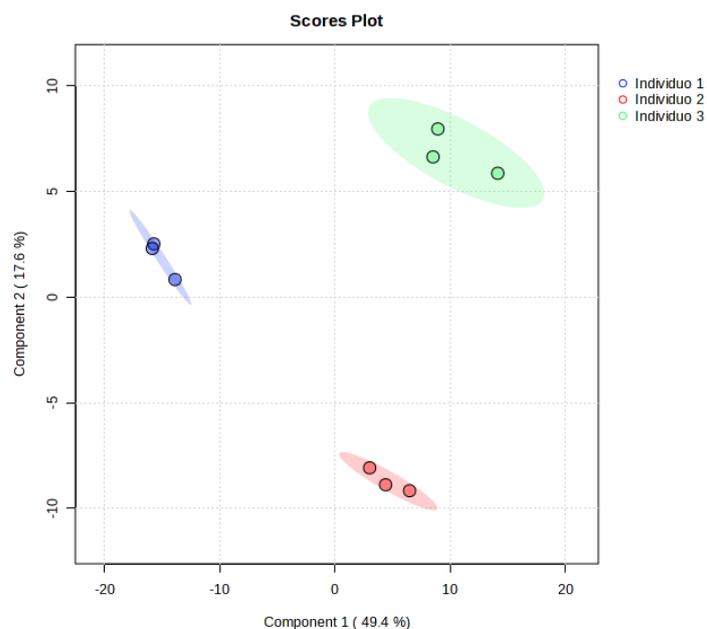


Figura 27. Gráfico de Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA) del triplicado de muestras de aire exhalado de tres individuos.

Finalmente, en la Figura 28 se muestra un mapa de calor de las 25 características metabólicas más significativas. Cada celda coloreada del mapa corresponde a un valor del área normalizada en la tabla de datos, las muestras individuales en filas y las características en columnas. El dendrograma muestra un agrupamiento jerárquico, donde 9 muestras se clasifican en los tres perfiles metabólicos de los individuos con éxito, por lo tanto, con la metodología propuesta se consigue distinguir la huella metabólica del aire exhalado en las tres personas sanas seleccionadas para este estudio.

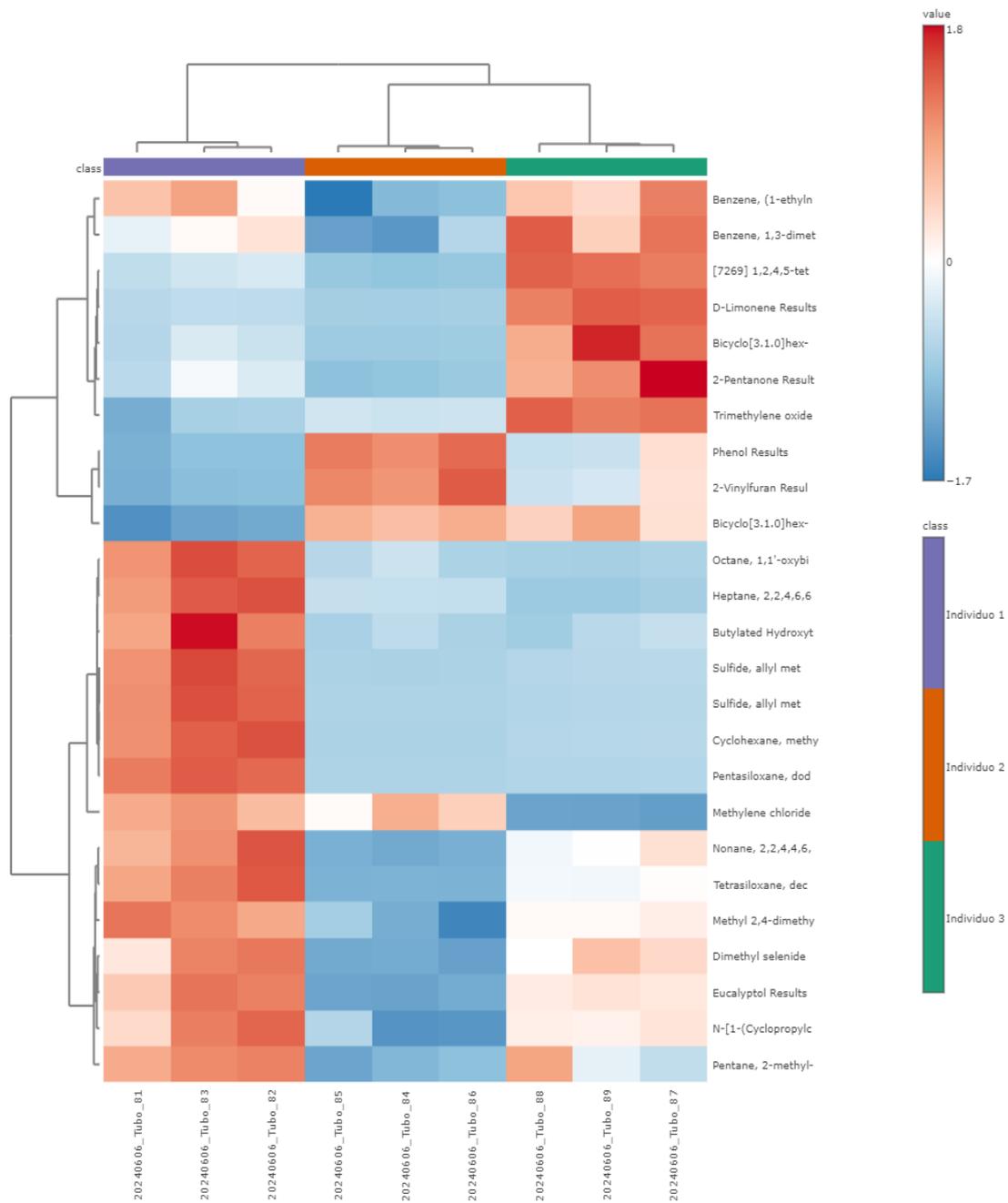


Figura 28. Análisis de mapas de calor de los 25 metabolitos más significativos.

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos a lo largo de este Trabajo Fin de Máster podemos concluir que:

1. Se han optimizado los siguientes parámetros instrumentales del sistema de desorción térmica para la medida de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) en aire respirado: temperatura del gas portador, flujo de gas portador en dirección de muestreo, temperatura de desorción del tubo, flujo de desorción del tubo, temperatura de atrapamiento, temperatura de desorción de la trampa y tiempo de desorción de la trampa.
2. Se ha evaluado una estrategia de estandarización interna mediante la adición de 9 patrones internos que no están presentes en muestras reales obteniendo desviaciones estándar relativas (% RSD) entre replicas inferiores al 3 % para los compuestos del material de referencia analizado.
3. Esta estrategia de estandarización interna se evaluó en el análisis de varias réplicas del mismo aire exhalado, pero en esta ocasión los valores RSD de los analitos fueron inferiores al 40 %. Utilizando una normalización con el área de pico total o la señal iónica total se obtuvieron valores por debajo del 30 %. Estos resultados se achacaron a la adición del patrón interno previa a la toma de muestra de aire exhalado.
4. La metodología analítica se evaluó de una manera preliminar para el análisis multivariante de tres muestras metabólicas procedentes de tres individuos diferentes demostrándose la capacidad de discriminación del método entre los diferentes perfiles metabólicos.

Los resultados obtenidos en este proyecto han permitido sentar las bases en la optimización de los parámetros experimentales del sistema de desorción térmica y del sistema GC-TOF. No obstante, aún queda un largo camino por recorrer hasta optimizar completamente la metodología y poder aplicar este tipo de análisis en muestras reales de pacientes sanos y enfermos de cáncer de pulmón.

6. Trabajos futuros

Respecto a la estrategia de estandarización interna, sería conveniente evaluar la reproducibilidad del sistema CSLR añadiendo los patrones internos en fase líquida después de llevar a cabo el muestreo del aire exhalado. Continuando con esta idea, resulta necesario evaluar y optimizar un sistema de acoplamiento en línea de estándares internos en fase gas, tanto durante la desorción del tubo, como durante el proceso de pre-concentración en la trampa. Esto permitiría la comparación con la estrategia anterior con el objetivo de obtener una estandarización interna de las muestras lo más eficiente posible.

El gran objetivo a largo plazo de este proyecto es la colaboración con el Área de Pulmón del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), para el análisis de muestras de pacientes control, pacientes fumadores sin una patología pulmonar neoplásica, pacientes con un estadio localizado (I-II-III A) o pacientes un estado avanzado (IIIB-IV). El éxito final de este proyecto reside en el descubrimiento de potenciales marcadores específicos de la enfermedad, y su posterior validación como biomarcador específico del cáncer de pulmón en aire exhalado, preferiblemente en estadios tempranos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Vailati-Riboni, V. Palombo, and J. J. Loor, "What Are Omics Sciences?," in *Periparturient Diseases of Dairy Cows*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–7. doi: 10.1007/978-3-319-43033-1_1.
- [2] M. Debnath, G. B. K. S. Prasad, and P. S. Bisen, "Omics Technology," in *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2010, pp. 11–31. doi: 10.1007/978-90-481-3261-4_2.
- [3] C. H. Johnson, J. Ivanisevic, and G. Siuzdak, "Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 17, no. 7, pp. 451–459, Jul. 2016, doi: 10.1038/nrm.2016.25.
- [4] G. J. Patti, O. Yanes, and G. Siuzdak, "Metabolomics: the apogee of the omics trilogy," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 13, no. 4, pp. 263–269, Apr. 2012, doi: 10.1038/nrm3314.
- [5] F. Danzi *et al.*, "To metabolomics and beyond: a technological portfolio to investigate cancer metabolism," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 8, no. 1, p. 137, Mar. 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01380-0.
- [6] D. S. Wishart *et al.*, "HMDB: the Human Metabolome Database," *Nucleic Acids Res*, vol. 35, no. Database, pp. D521–D526, Jan. 2007, doi: 10.1093/nar/gkl923.
- [7] L. D. Roberts, A. L. Souza, R. E. Gerszten, and C. B. Clish, "Targeted Metabolomics," *Curr Protoc Mol Biol*, vol. 98, no. 1, Apr. 2012, doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.
- [8] T. Mairinger, T. J. Causon, and S. Hann, "The potential of ion mobility–mass spectrometry for non-targeted metabolomics," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 42, pp. 9–15, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.cbpa.2017.10.015.
- [9] Z. Li, Y. Lu, Y. Guo, H. Cao, Q. Wang, and W. Shui, "Comprehensive evaluation of untargeted metabolomics data processing software in feature detection, quantification and discriminating marker selection," *Anal Chim Acta*, vol. 1029, pp. 50–57, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.05.001.
- [10] S. P. Putri *et al.*, "Current metabolomics: Practical applications," *J Biosci Bioeng*, vol. 115, no. 6, pp. 579–589, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.007.
- [11] D. S. Wishart, "Metabolomics: applications to food science and nutrition research," *Trends Food Sci Technol*, vol. 19, no. 9, pp. 482–493, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.tifs.2008.03.003.
- [12] H. Luan, "Machine learning for screening active metabolites with metabolomics in environmental science," *Environmental Science: Advances*, vol. 1, no. 5, pp. 605–611, 2022, doi: 10.1039/D2VA00107A.
- [13] D. G. Robertson, "Metabonomics in Toxicology: A Review," *Toxicological Sciences*, vol. 85, no. 2, pp. 809–822, Jun. 2005, doi: 10.1093/toxsci/kfi102.
- [14] "Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 69, no. 3, pp. 89–95, Mar. 2001, doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
- [15] M. Mamas, W. B. Dunn, L. Neyses, and R. Goodacre, "The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease," *Arch Toxicol*, vol. 85, no. 1, pp. 5–17, Jan. 2011, doi: 10.1007/s00204-010-0609-6.
- [16] B. Faubert, A. Solmonson, and R. J. DeBerardinis, "Metabolic reprogramming and cancer progression," *Science (1979)*, vol. 368, no. 6487, Apr. 2020, doi: 10.1126/science.aaw5473.

- [17] B. C. Bade and C. S. Dela Cruz, "Lung Cancer 2020," *Clin Chest Med*, vol. 41, no. 1, pp. 1–24, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ccm.2019.10.001.
- [18] Y. Tang, Z. Li, L. Lazar, Z. Fang, C. Tang, and J. Zhao, "Metabolomics workflow for lung cancer: Discovery of biomarkers," *Clinica Chimica Acta*, vol. 495, pp. 436–445, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.cca.2019.05.012.
- [19] M. S. Monteiro, M. Carvalho, M. L. Bastos, and P. Guedes de Pinho, "Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery: Advances and Challenges," *Curr Med Chem*, vol. 20, no. 2, pp. 257–271, Jan. 2013, doi: 10.2174/092986713804806621.
- [20] A. W. Boots, J. J. B. N. van Berkel, J. W. Dallinga, A. Smolinska, E. F. Wouters, and F. J. van Schooten, "The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease," *J Breath Res*, vol. 6, no. 2, p. 027108, Jun. 2012, doi: 10.1088/1752-7155/6/2/027108.
- [21] M. Malik, T. Demetrowitsch, K. Schwarz, and T. Kunze, "New perspectives on 'Breathomics': metabolomic profiling of non-volatile organic compounds in exhaled breath using DI-FT-ICR-MS," *Commun Biol*, vol. 7, no. 1, p. 258, Mar. 2024, doi: 10.1038/s42003-024-05943-x.
- [22] W. Miekisch, J. K. Schubert, and G. F. E. Noeldge-Schomburg, "Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds," *Clinica Chimica Acta*, vol. 347, no. 1–2, pp. 25–39, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.cccn.2004.04.023.
- [23] P. Wang *et al.*, "Identification of lung cancer breath biomarkers based on perioperative breathomics testing: A prospective observational study," *EClinicalMedicine*, vol. 47, p. 101384, May 2022, doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101384.
- [24] S. T. Ovbude *et al.*, "Applications of chromatographic methods in metabolomics: A review," *Journal of Chromatography B*, vol. 1239, p. 124124, May 2024, doi: 10.1016/j.jchromb.2024.124124.
- [25] K. D. Bartle and P. Myers, "History of gas chromatography," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, no. 9–10, pp. 547–557, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00806-3.
- [26] A. Abdu Hussen, "High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review," *Annals of Advances in Chemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 010–020, Jun. 2022, doi: 10.29328/journal.aac.1001026.
- [27] A. M. Haag, "Mass Analyzers and Mass Spectrometers," in *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*, 2016, pp. 157–169. doi: 10.1007/978-3-319-41448-5_7.
- [28] L. D. Roberts, "Defining the metabolic effect of peroxisome proliferator-activated receptor δ activation," University of Cambridge, 2010.
- [29] Y. Chen, E.-M. Li, and L.-Y. Xu, "Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow," *Metabolites*, vol. 12, no. 4, p. 357, Apr. 2022, doi: 10.3390/metabo12040357.
- [30] W. Ibrahim *et al.*, "Diagnosis of COVID-19 by exhaled breath analysis using gas chromatography–mass spectrometry," *ERJ Open Res*, vol. 7, no. 3, pp. 00139–02021, Jul. 2021, doi: 10.1183/23120541.00139-2021.
- [31] M. J. Wilde *et al.*, "Breath analysis by two-dimensional gas chromatography with dual flame ionisation and mass spectrometric detection – Method optimisation and integration within a large-scale clinical study," *J Chromatogr A*, vol. 1594, pp. 160–172, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.02.001.

ANEXO I. Composición del material certificado de referencia de los 52 compuestos volátiles en metanol.

Tabla 4. Compuestos del material certificado de referencia de aire con 52 compuestos volátiles, junto a su fórmula molecular, el tiempo de retención y punto de ebullición.

Compuesto	Fórmula molecular	tR (min)	Punto de ebullición (°C)
Acetona	C ₃ H ₆ O	1,775	56,08
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	1,8469	39,75
1-propanol	C ₃ H ₈ O	1,927	97,2
Hexano	C ₆ H ₁₄	2,2044	68,73
2-butanona	C ₄ H ₈ O	2,2055	79,59
Cloroformo	CHCl ₃	2,3135	61,12
Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	2,3284	77,1
2,4-dimetilpentano	C ₇ H ₁₆	2,3866	80,55
1,1,1-tricloroetano	C ₂ H ₃ Cl ₃	2,5742	74
1,2-dicloroetano d4	C ₂ H ₄ Cl ₂	2,5941	83,4
Butanol	C ₄ H ₁₀ O	2,7253	117,6
Benceno	C ₆ H ₆	2,7298	80,08
Tetracloruro de carbono	CCl ₄	2,7378	76,7
Isooctano	C ₈ H ₁₈	2,9779	99,238
1,2-dicloropropano	C ₃ H ₆ Cl ₂	3,1273	96,4
Tricloroetileno	C ₂ HCl ₃	3,1382	87,2
Heptano	C ₇ H ₁₆	3,1397	98,38
Bromodiclorometano	CHBrCl ₂	3,2202	90
4-metil-2-pentanona	C ₆ H ₁₂ O	3,6709	115,7
Tolueno	C ₇ H ₈	4,0412	110,6
Dibromoclorometano	CHBr ₂ Cl	4,4432	121.3 a 121.8
Octano	C ₈ H ₁₈	4,5062	125,62
Tetracloroetileno	C ₂ Cl ₄	4,6620	121,2
N-butil acetato	C ₆ H ₁₂ O ₂	4,7241	126,0
Etilbenceno	C ₈ H ₁₀	5,4376	136,2
O-xileno	C ₈ H ₁₀	5,5514	144,5
M-xileno	C ₈ H ₁₀	5,5521	139,1
Estireno	C ₈ H ₈	5,866	145,3
P-xileno	C ₈ H ₁₀	5,9031	138,3
Nonano	C ₉ H ₂₀	5,9603	150,47
(1S)-(-)-alfa-pineno	C ₁₀ H ₁₆	6,4893	155.00 a 157.00
2-etiltolueno	C ₉ H ₁₂	6,8673	165,15
1,2,4-trimetilbenceno	C ₉ H ₁₂	6,9563	168,89
(-)-beta-pineno	C ₁₀ H ₁₆	7,0987	165.00 a 167.00
4-etiltolueno	C ₉ H ₁₂	7,1199	161,95
1,3,5-trimetilbenceno	C ₉ H ₁₂	7,2999	164,7
Decano	C ₁₀ H ₂₂	7,3261	174,1
1,4-diclorobenceno	C ₆ H ₄ Cl ₂	7,5562	173,9
3-etiltolueno	C ₉ H ₁₂	7,6913	161,35
1,2,3-trimetilbenceno	C ₉ H ₁₂	7,6969	176,12

(R)-(+)-limoneno	$C_{10}H_{16}$	7,7584	177,6
Undecano	$C_{11}H_{24}$	8,5700	195,9
Nonanal	$C_9H_{18}O$	8,6414	195
1,2,4,5-tetrametilbenceno	$C_{10}H_{14}$	8,8476	196,85
Dodecano	$C_{12}H_{26}$	9,7086	216,3
Decanal	$C_{10}H_{20}O$	9,7965	212
Tridecano	$C_{13}H_{28}$	10,7697	235,4
Tetradecano	$C_{14}H_{30}$	11,7605	253,57
Pentadecano	$C_{15}H_{32}$	12,6980	270,6
Hexadecano	$C_{16}H_{34}$	13,5864	286,9
Etanol	C_2H_6O	-	78,24
2-propanol	C_3H_8O	-	82,3