



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

## **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

### **Trabajo Fin de Máster**

**EVALUACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS  
ORGÁNICOS VOLÁTILES EN ALIENTO PARA LA  
BÚSQUEDA DE POSIBLES BIOMARCADORES EN  
DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD**

**JOSE MARÍA ABAD FERNÁNDEZ**

**Oviedo, julio de 2021**



## Resumen

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad ocular neurodegenerativa que constituye una de las principales causas de pérdida de la visión central irreversible en mayores de 60 años, en países desarrollados. Esta disfunción visual se encuentra asociada a la degeneración de las células pertenecientes a las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y a la formación de depósitos extracelulares en la mácula de la retina, denominados drusas. En el presente Trabajo Fin de Máster se puso a punto un método para analizar el perfil de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) presentes en el aire exhalado para, posteriormente, aplicarlo a la búsqueda de biomarcadores de DMAE. Para ello, se empleó la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) complementada con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y un tratamiento final de los datos basado en los softwares MZmine y NIST MS Search, con el objetivo de realizar una comparativa entre dos grupos de edad (uno de menores de 30 años y otro de mayores de 60), estudiar si existían VOCs característicos para ambos grupos e identificar los potenciales biomarcadores. Debido a la falta de tiempo para la realización del trabajo, no se consiguieron muestras de aliento de pacientes con DMAE para su estudio posterior, pero se logró optimizar el método para, en un futuro, evaluarlo para dicha patología. Tras el tratamiento de datos con los softwares MZmine 2 y NIST MS Search, se llevó a cabo un análisis ANOVA, concluyéndose la presencia mayoritaria de 3 compuestos en aliento en ambos grupos de edad: trimetilnitrosourea ( $C_4H_9N_3O_2$ ), 3-metil-5-(1-metiletil)-fenolmetilcarbamato ( $C_{12}H_{17}NO_2$ ) y N-(2-metoxifenil)-3-oxo-butanamida ( $C_{11}H_{13}NO_3$ ). Sin embargo, no se apreció que estos fueran característicos de ninguno de los dos grupos de edad, concluyéndose de este modo que no se hallaron diferencias en el patrón de VOCs en aliento exhalado entre ambos grupos.

## Listado de abreviaturas

**DMAE:** degeneración macular asociada a la edad

**EPR:** epitelio pigmentario de la retina

**VOCs:** compuestos orgánicos volátiles (Volatile Organic Compounds)

**EBC:** condensado del aliento exhalado (Exhaled Breath Condensate)

**PVF:** polifluoruro de vinilo

**PVDF:** polifluoruro de vinilideno

**ppm:** partes por millón

**ppb:** partes por billón

**ppt:** partes por trillón

**SPME:** microextracción en fase sólida (Solid-Phase Microextraction)

**GC:** cromatografía de gases (Gas Chromatography)

**MS:** espectrometría de masas

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)

**PAHs:** compuestos aromáticos policíclicos

**PDMS:** polidimetilsiloxano

**DVB:** divinilbenceno

**CAR:** carboxeno

**PA:** poliacrilato

**CW:** carbowax

**FID:** detector de ionización de llama (Flame Ion Detector)

**IMS:** espectrometría de movilidad iónica (Ion-Mobility Spectrometry)

**EI:** ionización electrónica (Electronic Ionization)

**CI:** ionización química (Chemical Ionization)

**NIST:** National Institute of Standards and Technology

**PFTBA:** perfluorotributilamina

**MS/MS:** espectrometría de masas en tándem

**ADAP:** Automated Data Analysis Pipeline

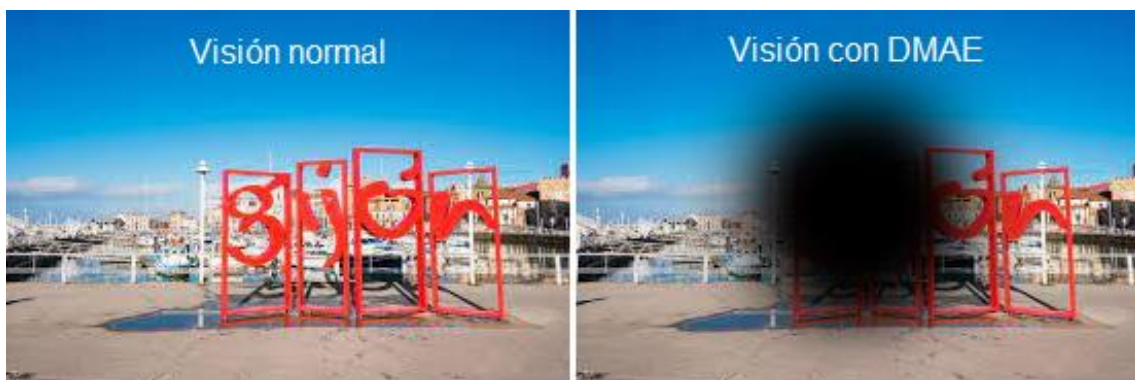
# Índice

1. Introducción.....	1
1.1. La degeneración macular asociada a la edad .....	1
1.2. Anatomía de la retina .....	1
1.3. Patología de la DMAE .....	2
1.4. Clasificación de las formas de DMAE.....	3
1.5. Diagnóstico y tratamiento de la DMAE .....	4
1.6. Biomarcadores de la DMAE .....	6
1.7. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) .....	7
1.8. Análisis de aire exhalado .....	8
1.8.1. Muestreo de aliento .....	9
1.8.2. Preconcentración de la muestra .....	10
1.8.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	12
2. Objetivos.....	15
3. Procedimiento Experimental.....	16
3.1. Instrumentación empleada.....	16
3.2. Materiales y reactivos .....	17
3.3. Protocolo de muestreo.....	17
3.4. Parámetros de medida en el GC-MS .....	18
3.5. Estudio comparativo de los compuestos presentes en el aliento.....	19
4. Resultados y discusión .....	22
4.1. Optimización de las condiciones de análisis.....	22
4.1.1. Selección de la fibra de SPME .....	22
4.1.2. Optimización del tiempo de exposición a la fibra .....	25
4.1.3. Optimización de la temperatura de exposición a la fibra .....	26
4.1.4. Estudio de los fondos en función de la localización de toma de muestra .....	27
4.2. Estudio comparativo de los compuestos presentes en el aliento.....	29
5. Conclusiones.....	33
6. Bibliografía.....	34

# 1. Introducción

## 1.1. La degeneración macular asociada a la edad

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad ocular de alta incidencia en países desarrollados y que provoca la pérdida de visión central irreversible en adultos mayores de 60 años.<sup>1,2</sup> Se trata de una enfermedad neurodegenerativa asociada al envejecimiento que daña una parte de la retina denominada mácula, responsable de la visión central, y cuyos efectos se muestran en la Figura 1 a modo de comparación entre una visión normal y una simulación de la percepción visual de un paciente con DMAE. Debido al envejecimiento exponencial de la población, es muy probable que su prevalencia aumente en el futuro, si bien factores como la predisposición genética, la alimentación, el tabaquismo, la obesidad y factores medioambientales pueden aumentar el riesgo de desarrollar dicha enfermedad.<sup>2,3</sup> En la actualidad, se estima que el número de afectados globalmente por esta patología es de 196 millones de personas, mientras que, para el año 2040, se estima un notable aumento de afectados hasta llegar a 288 millones.<sup>1</sup>



*Figura 1. Percepción visual normal (izquierda) comparada con la percepción visual de un paciente con DMAE (derecha).*

## 1.2. Anatomía de la retina

La retina es un tejido neural del ojo que posee células fotorreceptoras y células gliales, gracias a las cuales el ojo puede percibir imágenes.<sup>4</sup> Esto se consigue mediante la entrada en el ojo de los fotones de luz visible, a través de la pupila, y su posterior transmisión a lo largo de las vías neuronales en forma de señales eléctricas que permiten al cerebro percibir dichas imágenes. Con respecto a la estructura de la retina (Figura 2), consta de tres componentes principales: las capas de la retina, las células fotorreceptoras y la mácula. Por un lado, las capas de la retina son un conjunto de tejidos con funciones estructurales y de conexión neuronal, mientras que las células fotorreceptoras (conos y bastones) están ubicadas en la zona posterior de las capas retinianas, alejadas de la pupila. Los bastones, localizados en la periferia de la retina, son más

sensibles a la luz tenue, mientras que los conos, localizados en el centro de la retina, son sensibles a la luz del día, capturando longitudes de onda de luz coloreada. Finalmente, la mácula es un tejido sensible a la luz que se localiza en el centro de la retina, en el fondo del ojo, y ofrece mayor agudeza visual.<sup>4,5</sup> Esto es debido a que contiene la concentración más densa de fotorreceptores dentro de la retina, permitiendo que la persona pueda observar detalles finos, leer y reconocer rostros.<sup>6</sup>

La retina posee un metabolismo muy activo y es el tejido con mayor consumo de oxígeno por unidad de peso del cuerpo humano. La retina se encuentra irrigada por dos sistemas circulatorios independientes, los vasos retinianos y los vasos coroideos. Por un lado, el sistema retinal proporciona oxígeno y nutrientes a las dos terceras partes de la retina, mientras que el sistema coroidal se encarga de abastecer a la parte restante. La capa más externa de la retina es el denominado epitelio pigmentario de la retina (EPR), el cual forma parte de la barrera hemato-ocular y se encarga del transporte de nutrientes, la renovación de las células fotorreceptoras y la secreción de citocinas.<sup>6</sup> En el interior del ojo, en contacto con el EPR se localiza la membrana de Bruch, que está encargada de suministrar sangre a las capas externas de la retina.

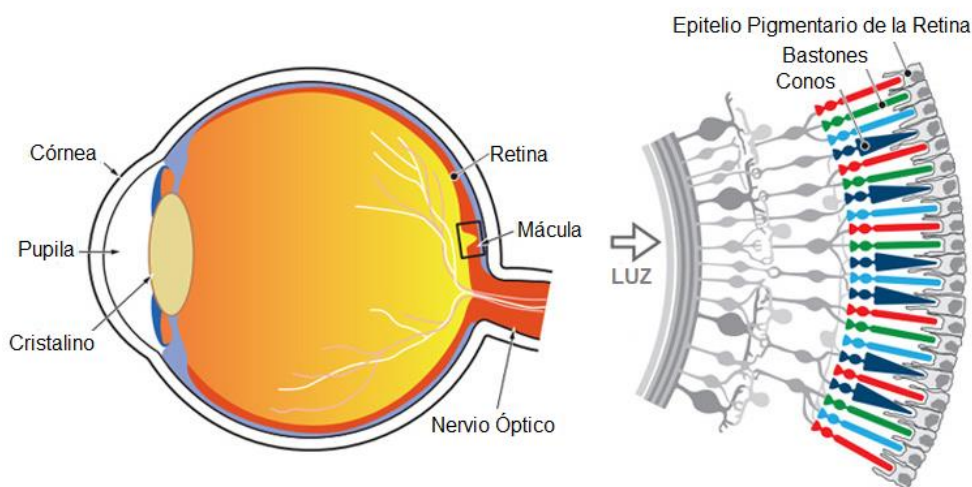


Figura 2. Representación esquemática del ojo y ampliación de la retina.<sup>7</sup>

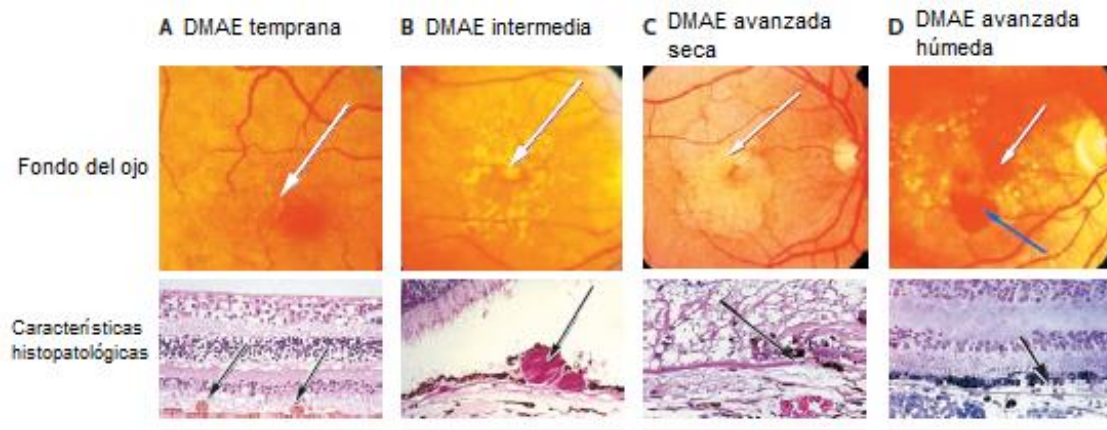
### 1.3. Patología de la DMAE

Los efectos producidos por la DMAE se basan en una progresiva degeneración de las células pertenecientes al EPR.<sup>8</sup> En primer lugar, se produce una inflamación crónica de la mácula debida a una alteración en la eliminación del material celular de desecho. De este modo, dicha inflamación desemboca en el desarrollo de unos depósitos celulares entre el EPR y la membrana de Bruch denominados drusas, cuyo tamaño y número aumenta con la edad. Estas drusas,

interfieren en el metabolismo dificultando por ejemplo el aporte de nutrientes con los fotorreceptores, dando lugar a un aumento progresivo del estrés oxidativo en las células del EPR que culmina en una degeneración de la región macular de la retina, provocando de este modo la enfermedad.

#### 1.4. Clasificación de las formas de DMAE

Si bien existen múltiples clasificaciones para la DMAE, la más empleada utiliza como criterio el aspecto que tiene el fondo del ojo y los efectos de la enfermedad en los tejidos. Así, se distingue: DMAE temprana, DMAE intermedia, DMAE avanzada (que puede ser de tipo húmedo o seco).<sup>6</sup> En la Figura 3 se muestran imágenes de las lesiones asociadas los cuatro tipos de DMAE junto al aspecto del ojo según la clase.



*Figura 3. Clasificación de las clases de DMAE junto a su aspecto en el fondo del ojo y sus características histopatológicas.<sup>6</sup> En las columnas A y B, las flechas blancas y negras señalan la presencia de drusas; en la columna C, la flecha blanca señala la zona de atrofia geográfica formada y la flecha negra, la misma atrofia junto a una pérdida parcial de la membrana de Bruch; en la columna D, la flecha azul señala una hemorragia subretinal y las flechas blanca y negra, una neovascularización coroidal.*

- **DMAE temprana:** en los estadios iniciales de la enfermedad, se puede observar la presencia de depósitos celulares (drusas) de tamaño medio, así como anomalías pigmentarias en la retina, ya sea hipopigmentación o hiperpigmentación. La pérdida de visión suele ser leve o, incluso, nula. No obstante, pueden darse otra clase de síntomas como son la visión borrosa, una menor adaptación de la visión a la oscuridad y/o la dificultad para leer tamaños de fuente reducidos.
- **DMAE intermedia:** esta fase de la enfermedad se caracteriza por la presencia de, al menos, una drusa de gran tamaño, y varias drusas de tamaño medio. Además, destaca el hecho de que se produce una atrofia geográfica de la mácula, que no llega a



extenderse a la parte central, y que se manifiesta en el paciente mediante la aparición de zonas oscuras en el campo de visión.

- DMAE avanzada seca: es el primero de los dos tipos de DMAE avanzada y es el más benigno y el más comúnmente desarrollado. La DMAE seca se caracteriza por la presencia de drusas y una atrofia geográfica de la mácula que se extiende a su parte central. Los pacientes afectados por esta clase de DMAE suelen experimentar una pérdida de visión gradual con el tiempo.
- DMAE avanzada húmeda: se trata de la clase más grave de DMAE pues y aunque su prevalencia se encuentra entre el 10 y el 15% del total de casos de afectados por DMAE, es responsable de más del 80% de casos de pérdida de visión y ceguera. La DMAE húmeda se caracteriza por la formación de hemorragias debidas al crecimiento anormal de vasos sanguíneos a través del EPR (neovascularización coroidal).

### 1.5. Diagnóstico y tratamiento de la DMAE

La ausencia de herramientas de diagnóstico precoz de la DMAE hace que los pacientes con dicha enfermedad sufran los efectos de una enfermedad neurodegenerativa que avanza de forma progresiva.<sup>8</sup> Por ello, el diagnóstico de la misma solo se produce cuando los síntomas son evidentes, lo que conlleva que la enfermedad se encuentre en un estado avanzado. Estas personas suelen presentar distorsión, visión borrosa o un escotoma (punto ciego de visión) en su visión central, siendo estos síntomas más característicos de la DMAE avanzada húmeda, pues se manifiestan de forma rápida una vez alcanzado dicho estadio de la enfermedad.<sup>9</sup> Sin embargo, al igual que ocurre con los pacientes con DMAE avanzada seca, estos pueden ser asintomáticos o presentar una ligera distorsión visual, la cual se podría detectar únicamente de forma accidental en una evaluación optométrica rutinaria.

Cuando se da el caso en el que los pacientes presentan drusas y únicamente cambios pigmentarios leves en el fondo del ojo, es posible que su agudeza visual se encuentre dentro de los parámetros normales, lo cual no ocurre en el caso de los enfermos de DMAE avanzada.<sup>9</sup> Para su diagnóstico, mediante un examen del fondo del ojo con un método de visualización estereoscópica, se puede detectar la presencia de drusas, cambios pigmentarios, hemorrágicos o atróficos que afectan a la mácula. Sin embargo, con un examen no estereoscópico se puede pasar por alto el engrosamiento o la elevación de la retina que se produce debido la DMAE avanzada húmeda, lo cual supone un impedimento potencial a la hora de diagnosticarla.

Asimismo, mediante el denominado test de la rejilla de Amsler (Figura 4), se puede evaluar la distorsión central o la presencia de un escotoma, pues consiste en una cuadrícula con líneas horizontales, verticales y un punto central en la cual, si se observan regiones borrosas, distorsionadas o más oscuras unas que otras, se puede tratar de un signo de la enfermedad, por lo que se debería consultar con un oftalmólogo.<sup>6,9</sup>

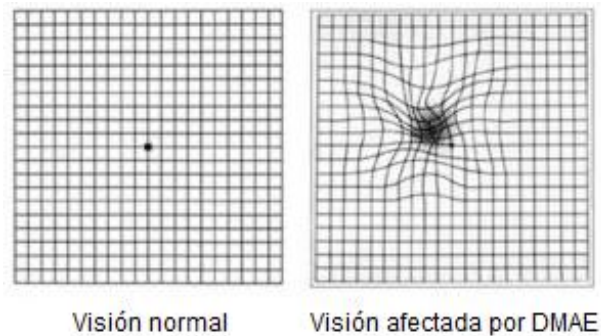


Figura 4. Rejilla de Amsler vista por una persona sin DMAE (izquierda) y por una persona con la enfermedad (derecha).<sup>10</sup>

Como se ha indicado con anterioridad, la DMAE es una enfermedad que no posee cura conocida y además los daños que ocasiona son irreversibles. No obstante, existen algunas estrategias que pueden ralentizar el desarrollo de la enfermedad, presentando una efectividad limitada. Por un lado, en lo que respecta a la DMAE avanzada seca, así como las etapas iniciales de la misma, únicamente destaca el empleo de suplementos nutricionales de zinc, vitaminas (vitamina E, vitamina C, betacaroteno) y antioxidantes, todo ello combinado con la práctica de hábitos de vida saludables y una dieta equilibrada para, de este modo, conseguir que la enfermedad no continúe su progreso.<sup>11</sup> Por otro lado, en lo que respecta a la DMAE avanzada húmeda, existe una serie de tratamientos experimentales entre los cuales destacan, principalmente, las inyecciones intravítreas de factores anti-angiogénicos.<sup>12</sup> Estos factores son agentes biológicos o químicos que reducen o inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos, la cual es una característica de la DMAE, y se hace uso de los mismos debido a que, en algunos casos, han demostrado una mayor eficacia a la hora de disminuir la velocidad de progresión de la pérdida de visión. Sin embargo, estudios recientes señalan que se trata de una estrategia de elevado coste y que, a largo plazo, puede no ser efectiva. Además de los factores anti-angiogénicos, destacan también otras técnicas que pueden emplearse en combinación con estos, como por ejemplo la terapia fotodinámica con *verteporfin* y la fotocoagulación con láser térmico.<sup>11,12</sup> La terapia fotodinámica está basada en el uso de una sustancia denominada *verteporfin*, que destruye las formaciones vasculares al activarse por efecto de la luz, siendo esta administrada

por vía intravenosa. Mientras que la fotocoagulación con láser térmico se basa en el empleo de un láser de un gas que trabaja a longitudes de onda que se encuentren en el ámbito del visible-ultravioleta para así conseguir eliminar la neovascularización ocasionada por la enfermedad.<sup>11</sup>

## 1.6. Biomarcadores de la DMAE

Los biomarcadores se definen formalmente como una característica que es medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.<sup>13</sup> Un biomarcador puede ser una sustancia, estructura o alteración bioquímica o molecular medida en partes del cuerpo, fluidos o productos que pueden afectar o predecir la incidencia de una enfermedad, permitiendo de este modo ayudar a estudiar los mecanismos de la misma y, así, identificar nuevos objetivos para la obtención de un tratamiento eficaz o favorecer un diagnóstico precoz.<sup>13,14</sup> El principal beneficio de los biomarcadores en el ámbito clínico y farmacéutico consiste en que permiten el desarrollo de nuevas herramientas para la detección de enfermedades, controlar la progresión de las mismas, evaluar la eficacia del tratamiento empleado y estudiar el riesgo asociado al mismo. En lo que respecta a la DMAE, en la actualidad no existe un tratamiento efectivo para más del 80% de casos (principalmente pacientes con DMAE temprana, intermedia y avanzada seca).<sup>2</sup> Este hecho hace que la identificación de nuevos biomarcadores de la enfermedad sea de vital importancia pues, de este modo, se lograría predecir de forma temprana, ayudando a su detección y diagnóstico precoz y, consecuentemente, a la prevención de la enfermedad. En este sentido, los biomarcadores son también fundamentales para identificar, por un lado, poblaciones de pacientes susceptibles a sufrir la enfermedad y, por otro, factores de riesgo que pueden conducir a enfermedades previas que desemboquen en el desarrollo de DMAE.<sup>13</sup>

La búsqueda de posibles biomarcadores para la DMAE se ha llevado a cabo en distintos fluidos biológicos tales como el humor acuoso<sup>15,16</sup> y el humor vítreo<sup>16</sup>, en lágrimas<sup>16</sup>, en orina<sup>17</sup> y, finalmente, en plasma<sup>18,19,20,21,22</sup> y suero sanguíneo<sup>22,23</sup>. En este sentido, destaca el papel que desempeñan determinados metabolitos, los cuales son sustancias, habitualmente orgánicas, que el cuerpo emplea o produce como consecuencia de los procesos metabólicos.<sup>2</sup> Por ello, el estudio de dichos metabolitos, también llamado metabolómica, presenta un gran potencial tanto para el análisis de determinadas enfermedades como para el desarrollo de nuevos fármacos.

En la Tabla 1 se han recogido una serie de metabolitos que pueden actuar como biomarcadores de la DMAE, así como el medio en el que se estudiaron.

*Tabla 1. Metabolitos que actúan como biomarcadores de la DMAE, así como las muestras biológicas en las que se encontraron y sus correspondientes estudios.*

Metabolito identificado	Muestra biológica	Referencia
Adenosina	Plasma	[18], [19]
Hipoxantina	Plasma, suero	[18], [23]
Tirosina	Plasma, suero	[20], [22]
Fenilalanina	Plasma, suero, humor acuoso	[20], [22], [15]
Creatina	Plasma, humor acuoso	[15]
Citrato	Plasma, orina, suero	[22], [17]
Carnitina	Plasma, humor acuoso	[21], [15]
Prolina	Plasma, humor acuoso	[21], [15]
Maltosa	Plasma, suero	[18], [23]

### 1.7. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

Los VOCs son compuestos que, bajo condiciones normales, son gaseosos o se pueden vaporizar fácilmente y entrar en la atmósfera. El cuerpo humano genera de forma continua esta clase de compuestos, expulsándose generalmente del organismo a través del aire exhalado y a través de la piel, si bien también pueden ser liberados a través de fluidos como la sangre o la orina.<sup>24</sup> Los VOCs pueden ser considerados como biomarcadores o metabolitos orgánicos, lo cual supone una importante ventaja a la hora de poder considerarlos como herramientas para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades. La principal ventaja que presentan estos compuestos consiste en que se producen en diferentes partes del cuerpo, concretamente en las células epiteliales pasando posteriormente al torrente sanguíneo y transportándose finalmente por todo el cuerpo. Finalmente, los VOCs procedentes de la sangre son transferidos a los pulmones a través de los alveolos, para terminar en el aliento exhalado. En lo que respecta al origen de estos compuestos, existen una serie de mecanismos que tienen como consecuencia el desarrollo de los mismos.<sup>25</sup> Destaca el caso de los hidrocarburos, los cuales se obtienen en el cuerpo debido a un proceso de estrés oxidativo, que se suele dar en casos de presencia de tumores, enfermedades inflamatorias o envejecimiento.

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios basados en la detección de VOCs en aliento exhalado para su empleo como biomarcadores de distintas enfermedades neurodegenerativas, como son el Alzheimer y el Parkinson, o diferentes tipos de cáncer, como son el cáncer oral o el cáncer de pulmón.<sup>25,26</sup> Dichos trabajos de investigación destacan una serie de compuestos volátiles estudiados tanto en sujetos sanos como en pacientes con dichas enfermedades, concluyéndose que los niveles de dichos compuestos son destacadamente elevados en pacientes, pudiendo emplearse los mismos como biomarcadores de enfermedad. No obstante, también se puede dar el caso de que los compuestos estudiados se encuentren menos expresados en pacientes, por lo que estas diferencias también deben tenerse en cuenta como biomarcadores potenciales. En lo que respecta al origen de dichos compuestos, destaca la hipótesis de que los VOCs encontrados en aliento se obtienen a partir de las células epiteliales que recubren los bronquios o pueden ser introducidos a partir de otros tejidos.<sup>24</sup> Además, la sangre es un fluido con una composición muy compleja y única para cada individuo, que puede llevar asociado un componente genético que depende de otros factores externos, como son el entorno o la dieta. Esto hace que dichos factores también contribuyan en la composición del patrón de VOCs que se disuelven en ella, que luego puede volver a volatilizarse en el aire exhalado, contribuyendo a la composición química total del mismo. De este modo, la cantidad y variedad de VOCs que hay presentes en el aliento es muy extensa. No obstante, a pesar de que, como se ha mencionado anteriormente, algunas enfermedades neurodegenerativas presentan estudios de estos compuestos en aliento, en el caso de la DMAE no se han encontrado referencias previas, lo cual hace que el presente trabajo sea de gran interés para estudiar el potencial de utilizar aire exhalado para la búsqueda de biomarcadores de una enfermedad ocular, la DMAE.

### 1.8 Análisis de aire exhalado

El aire exhalado consiste principalmente en nitrógeno, oxígeno, vapor de agua y gases inertes, si bien una parte del aliento contiene miles de componentes endógenos producidos a partir de actividades bioquímicas del cuerpo.<sup>27</sup> El análisis detallado de dichos componentes, puede proporcionar información acerca del estado metabólico y de las condiciones fisiológicas del organismo. Por este motivo, además de por su carácter no invasivo, las pruebas de aliento son una vía de gran interés para el diagnóstico y evaluación de los cambios fisiopatológicos que se encuentran asociados a distintas enfermedades, destacando las neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington; las pulmonares, la diabetes y distintos tipos de cánceres, como son el de pecho o el de próstata.<sup>27,28</sup>

Los principales problemas que surgen a la hora de realizar un estudio del aliento se basan en la falta de homogeneidad presente en el muestreo y en la falta de datos sobre los hábitos de los individuos que participan en el mismo. Por ello, la parte más complicada del trabajo consiste en elaborar un protocolo de trabajo que permita controlar el mayor número de variables posibles, así como en la interpretación final de los resultados obtenidos.

#### 1.8.1. Muestreo de aliento

La toma de muestra representa una de las etapas más importantes en el análisis de aire exhalado y han de tenerse en cuenta ciertas consideraciones, por ejemplo, no haber ingerido alimentos o lavarse los dientes durante un tiempo determinado antes de la toma de muestra y así evitar o reducir la presencia de cualquier olor exógeno residual. Para la realización del muestreo destacan dos técnicas, una basada en el uso de bolsas especialmente diseñadas para contener muestras gaseosas y otra basada en la recolección de condensado del aliento exhalado (EBC, *Exhaled Breath Condensate*), la cual es muy utilizada pero notablemente más cara que la primera. La técnica del EBC consiste en el empleo de dispositivos de recolección del aliento que se encuentran refrigerados, permitiendo analizar cambios producidos en las vías respiratorias.<sup>29</sup> De entre los distintos tipos de bolsas existentes, destacan las bolsas Tedlar (polifluoruro de vinilo, PVF), las Kynar (polifluoruro de vinilideno, PVDF) y las Flexfilm.<sup>30,31</sup> Diferentes estudios han señalado las bolsas de Tedlar como opción más apropiada para el estudio de VOCs en niveles de partes por billón (ppb) e incluso de partes por trillón (ppt), lo cual es debido a que de las otras dos clases de bolsas se dependen numerosos contaminantes, fundamentalmente hidrocarburos, y por tanto haciendo que solo sean apropiadas en el caso de que las concentraciones de VOCs en el aliento fuesen del orden de partes por millón (ppm). Asimismo, destaca también la mayor estabilidad de los analitos en las bolsas Tedlar con respecto a las otras dos posibilidades.<sup>30</sup> En la Figura 5 se muestra una bolsa Tedlar de 3 L de la casa comercial Supelco, similar a las utilizadas en este TFM.



Figura 5. Bolsa de Tedlar de la casa comercial Supelco.

No obstante, la emisión de contaminantes de las bolsas se puede disminuir mediante la realización de varios llenados sucesivos de las mismas con nitrógeno, si bien en el caso de los hidrocarburos no se consigue dicho objetivo. Otro aspecto importante a tener en cuenta es la estabilidad de los analitos una vez introducidos en las bolsas. En este caso, destacan nuevamente las bolsas Tedlar, las cuales presentan una mayor estabilidad para los hidrocarburos debido a la menor emisión de las bolsas.<sup>31</sup> Además, la recuperación de los compuestos estudiados es mayor cuando las bolsas se llenan al 80% de su capacidad total.

#### 1.8.2. Preconcentración de la muestra

La etapa de preconcentración de la muestra de aire exhalado es de gran importancia durante el proceso de análisis debido a que la mayoría de las sustancias que la componen se encuentran en concentraciones entre  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , empleándose con dicho objetivo la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid-phase microextraction*).<sup>32</sup> La SPME es una técnica de preparación de muestra que emplea una fibra de sílice fundida recubierta en su parte externa por una fase estacionaria.<sup>33</sup> En ella, los analitos de la muestra son extraídos y concentrados directamente en el recubrimiento de la fibra, dando lugar de este modo a un método que permite ahorrar en la compra y eliminación de disolventes, reduciendo el número etapas de preparación de muestra y puede dar lugar a una notable disminución en los tiempos de retención en la fibra requeridos. Además, destaca su buen funcionamiento en combinación con técnicas cromatográficas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), permitiendo no solo analizar una gran variedad de VOCs y compuestos orgánicos semivolátiles<sup>33,34</sup>, si no también compuestos

aromáticos policíclicos (PAHs)<sup>35,36</sup>, hidrocarburos policlorados<sup>35,36</sup>, fenoles<sup>37</sup> y pesticidas<sup>38</sup>, entre otros, en muestras biológicas, medioambientales, drogas y alimentos.<sup>33,34</sup>

La fibra de SPME se introduce en un soporte provisto de una aguja en cuyo interior se encuentra la fibra (ver Figura 6).<sup>33</sup> En la parte superior del soporte hay además un émbolo con resorte que permite exponer la fibra para el procedimiento de preconcentración. Tras finalizar el proceso de muestreo, la fibra se recoge y deja de exponerse. Además, dicho soporte está diseñado para utilizarse con distintos tipos de fibras reemplazables y reutilizables.

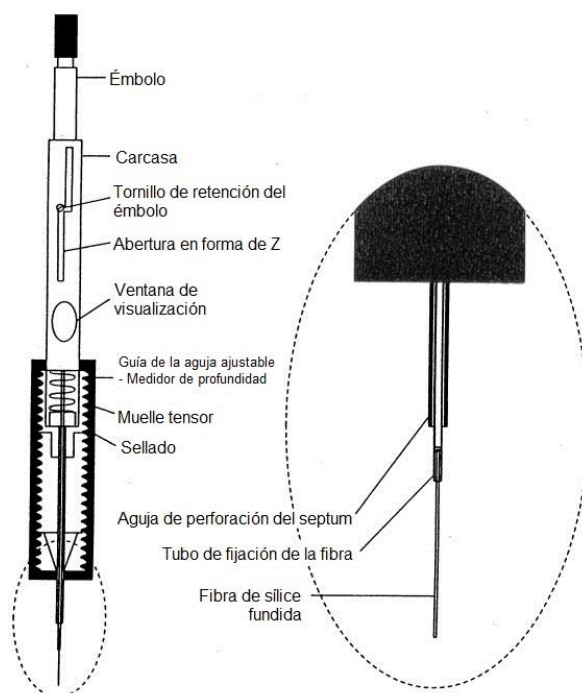


Figura 6. Esquema de un dispositivo comercial de soporte y fibra de SPME comercializado por Supelco.<sup>33</sup>

Posteriormente, en lo que respecta a la fase estacionaria que sirve de recubrimiento a la fibra, en función de su naturaleza existen diferentes clases de fibras comerciales, cuya selección depende de los analitos que sean objeto de estudio. Por un lado, la fibra de PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno) es la más adecuada cuando se desea estudiar hidrocarburos y analitos polares, pues presenta una gran eficiencia de absorción de distintos compuestos volátiles en aliento exhalado en comparación al resto de fibras existentes<sup>34</sup>, si bien la fibra de CAR/PDMS (Carboxeno/Polidimetilsiloxano) se suele emplear con el objetivo de detectar hidrocarburos y VOCs.<sup>33,34,39</sup> Por otro lado, las fibras de PA (Poliacrilato) y las de CW/DVB (Carbowax/Divinilbenceno) son aplicables para compuestos orgánicos polares, mientras que la fibra de PDMS se emplea para compuestos orgánicos no polares.



Finalmente, la fibra se expone a la muestra mediante la perforación del septum de la bolsa y, transcurrido un tiempo, los analitos que son objeto de estudio se reparten entre la fase estacionaria de la fibra y la muestra de aliento exhalado, alcanzando finalmente el equilibrio.<sup>34</sup> No obstante, en ocasiones se acorta el tiempo de exposición a la fibra, trabajando en condiciones de no equilibrio, con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis. Para terminar, la fibra es inyectada, en este caso, en el inyector del cromatógrafo de gases, para así proceder a su desorción térmica y posterior análisis.

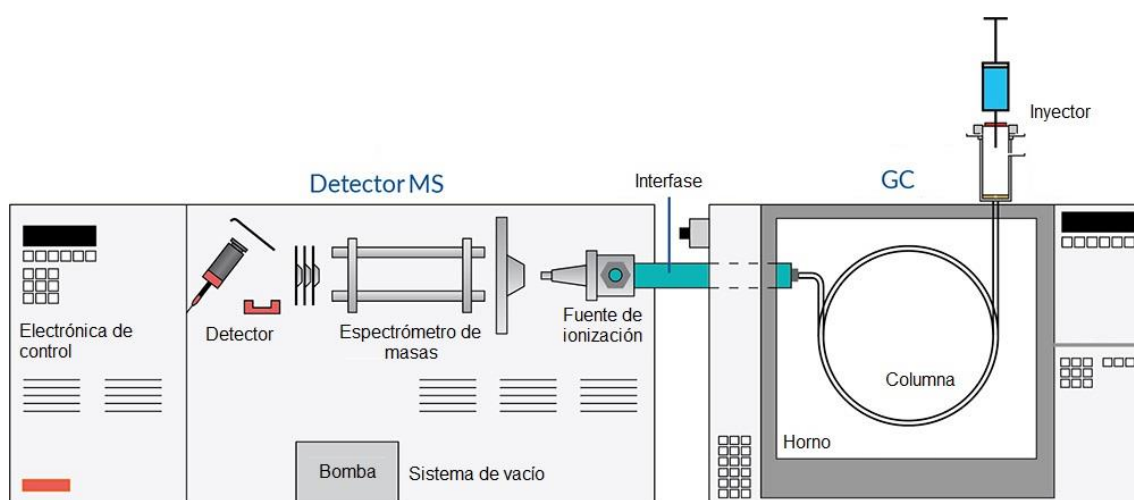
### 1.8.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Si bien la bibliografía recoge el uso de distintas técnicas analíticas para el análisis de aire exhalado, como por ejemplo el empleo de sensores químicos (basados en una serie de sensores de gas no selectivos, junto con una técnica de reconocimiento de patrones) o las técnicas de espectroscopía láser (capaces de detectar trazas de especies moleculares en gases en tiempo real), la cromatografía de gases es el método más comúnmente empleado, ya sea acoplada a MS, con un detector de ionización de llama (FID) o espectrometría de movilidad iónica (IMS).<sup>40,41,42</sup> De entre ellos, destaca la GC-MS debido a su sensibilidad y a la capacidad de identificación de compuestos (fundamentalmente VOCs) que contiene el aire exhalado, encontrándose los mismos en ppm o, incluso, en ppb.<sup>42</sup>

La GC es una técnica de separación que, al igual que el resto de las técnicas cromatográficas, implica una distribución de un compuesto entre dos fases diferentes, una móvil y una estacionaria.<sup>43</sup> En una mezcla, los compuestos se reparten en un grado diferente entre las fases dependiendo de su respectiva solubilidad en cada fase. A medida que los compuestos de una mezcla son transportados por la fase móvil sobre un lecho fijo de fase estacionaria, se retendrán en diferentes grados debido a su diferente afinidad por la misma, dando lugar a una separación física. Aquellos con mayor afinidad con la fase estacionaria tardarán más tiempo en salir de la columna cromatográfica que la contiene, mientras que aquellos con menor afinidad tardarán menos.

Para realizar el análisis mediante GC, la muestra se debe introducir en la cabeza de la columna cromatográfica, empleando para ello un inyector.<sup>40</sup> Existen dos modos de inyección: el modo split (con división de flujo) y el modo splitless (sin división de flujo). El modo split se emplea para analitos que se encuentran en concentraciones elevadas en la muestra, es decir, para componentes mayoritarios. Por otro lado, el modo splitless se emplea principalmente para analitos que se encuentran en concentraciones bajas en matrices complejas. Posteriormente, se hace uso de un flujo de gas inerte (como por ejemplo N<sub>2</sub>, He o H<sub>2</sub>) que actúa como fase móvil.

La separación de los distintos componentes de una muestra mediante GC se produce debido al orden de elución de la columna, que está relacionado con sus puntos de ebullición de los analitos, al aumentar de forma gradual la temperatura del horno en el cual se encuentra la columna cromatográfica. Al final de la misma, con el objetivo de identificar y/o cuantificar los compuestos analizados, se acopla un sistema de detección como el MS. La espectrometría de masas está basada en la medida de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones que se han generado previamente en la fuente de ionización para identificar y cuantificar los analitos. En la Figura 7 se muestra un esquema de la técnica GC-MS con sus diferentes componentes.



*Figura 7. Esquema de un cromatógrafo de gases acoplado mediante una interfase a un espectrómetro de masas con fuente de ionización electrónica.<sup>44</sup>*

La elección de MS como detector acoplado a GC se vuelve de gran importancia debido a que, por un lado, la GC puede llevar a cabo la separación de muchos compuestos volátiles y semivolátiles, aunque no siempre de forma selectiva, mientras que en MS sí se consiguen detectar de forma selectiva muchos compuestos diferentes.<sup>45</sup> Sin embargo, uno de los primeros problemas planteados consiste en las diferencias significativas de presión existentes entre ambas técnicas, pues el gas de GC sale del sistema aproximadamente a una presión de una atmósfera (760 torr), mientras que el MS utiliza un vacío de alrededor de  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  torr. Para solucionar dicho problema, se emplea una interfase, que es un compartimento en el que la columna se calienta a 280°C para evitar la condensación de los analitos y llevarlos directamente a la fuente de ionización, la cual también es calentada, y que es necesaria para ionizar las moléculas tras su salida de la columna cromatográfica.

En la actualidad, la fuente de ionización más empleada es la fuente de ionización electrónica (EI), mostrándose en la Figura 8 un ejemplo de la misma, si bien también se puede emplear una fuente de ionización química (CI).<sup>45,46</sup> La EI consiste en una pequeña cámara calentada (10 mm

aproximadamente) que contiene un filamento de Re o W, el cual está calentado y tiene forma de bobina o cable, y es capaz de emitir electrones. Estos son acelerados típicamente a un potencial de 70 eV que es aplicado entre el filamento y un ánodo.<sup>46,47</sup> Se emplea esa energía de ionización debido a que, a ese valor, se consigue una fragmentación de las moléculas reproducible e independiente del MS empelado.<sup>46,48</sup> Además, la trayectoria de las moléculas es perpendicular a la de los electrones, provocando de este modo la ionización y la fragmentación de las primeras debido a la pérdida de electrones por repulsiones electrostáticas. De este modo, se genera un catión radical  $M^+$ , denominado ion molecular. Con respecto a su valor de  $m/z$ , aun no siendo la misma masa, pues se pierde al menos un electrón, el detector no consigue discriminar este hecho, haciendo que el valor obtenido se corresponda con la masa molecular del analito original. Tras la formación de los iones, estos son separados en función de su relación  $m/z$  en el analizador de masas, fundamentalmente de tipo cuadrupolo, por su robustez, sus bajos requerimientos de vacío con respecto a otros analizadores de masas, su sensibilidad, su rápida capacidad de adquisición y por ser fáciles de acoplar a cualquier fuente de ionización. Cabe destacar también que los espectros de ionización obtenidos mediante EI son muy reproducibles y existen extensas bibliotecas de espectros de gran ayuda para la identificación de incógnitas, como por ejemplo la biblioteca de datos de MS desarrollada por el NIST (*National Institute of Standards and Technology*).<sup>49</sup>

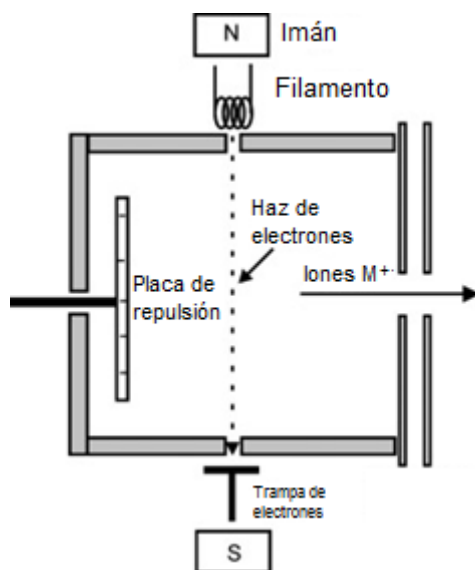


Figura 8. Esquema de una fuente de ionización electrónica.<sup>47</sup>

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo consiste en la puesta a punto de un método para analizar el perfil de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) presentes en el aire exhalado y su posterior aplicación para la búsqueda de biomarcadores de DMAE. Para llevar a cabo el objetivo propuesto, se recurrió a la microextracción en fase sólida (SPME) para la preconcentración de VOCs y se llevó a cabo la separación y detección de los VOCs mediante GC-MS. Finalmente, se llevó a cabo un tratamiento de datos estadístico.

Dada la disponibilidad de tiempo para la realización del TFM, no fue posible la comparación pacientes DMAE vs individuos control. Sin embargo, sí que se llevó a cabo una comparativa entre dos grupos de edad diferenciada (grupo 1: 20-30 años; grupo 2: 60-70) para i) estudiar si existen VOCs característicos para ambos grupos y ii) familiarizarse con el tratamiento de datos estadístico y de identificación que implica esta metodología de trabajo.

### 3. Procedimiento Experimental

#### 3.1. Instrumentación empleada

El equipo empleado para la realización del presente trabajo (Figura 9) fue un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), acoplado a Espectrómetro de Masas Agilent 7000 Triple Quad GC/MS, equipado con una fuente de ionización electrónica. El GC contaba con un inyector split/splitless y una columna capilar DB-5 MS de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase estacionaria (5% fenilmetilsiloxano). Finalmente, para el calentamiento de las bolsas Tedlar durante la exposición de la fibra de SPME, se empleó una estufa Memmert IN30 (Mettler-Toledo, Schwabach, Alemania).



*Figura 9. Equipo de cromatografía de gases Agilent GC 7890A acoplado al espectrómetro de masas Agilent 7000 GC/MS Triple Quad.*

Cabe destacar la importancia de realizar una optimización de las condiciones de trabajo del GC-MS antes de comenzar a realizar los análisis de las muestras. Para ello, se emplea un compuesto de calibración denominado perfluorotributilamina (PFTBA), de fórmula  $\text{N}(\text{C}_4\text{F}_9)_3$ . Este compuesto da lugar a 3 señales intensas de referencia, de valor de  $m/z$  igual a 69 ( $\text{CF}_3^+$ ), 264 ( $\text{C}_5\text{F}_{10}\text{N}^+$ ) y 502 ( $\text{C}_9\text{F}_{20}\text{N}^+$ ), gracias a los cuales el equipo hace un ajuste automático de la exactitud en masa para posteriores medidas en función de los valores de  $m/z$  experimentales a los cuales aparecen las señales.<sup>50</sup> Así mismo, se ajusta tanto la resolución como la selectividad, haciendo que la realización de un ajuste automático (“autotune”) sea fundamental.

### 3.2. Materiales y reactivos

- ✓ Fibra de SPME de PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$  para inyección manual (Supelco, Bellefonte, Pensilvania, Estados Unidos).
- ✓ Fibra de SPME de PDMS de 100  $\mu\text{m}$  para soporte manual (Supelco).
- ✓ Fibra de SPME de CAR/PDMS de 75  $\mu\text{m}$  para soporte manual (Supelco).
- ✓ Soporte manual de SPME (Supelco).
- ✓ Bolsas Tedlar (PVF, polifluoruro de vinilo) de 3 L, con válvula de bloqueo (Sigma-Aldrich, Alemania).
- ✓ Jeringa de 50  $\mu\text{L}$  (Hamilton, Reno, Nevada, Estados Unidos).
- ✓ Patrón de alcanos C8-C20, 40 ppm de cada uno en hexano (Sigma-Aldrich).
- ✓ Hexano (Sigma-Aldrich).

En el caso de las fibras, antes de ser utilizadas por primera vez, se activaron en el inyector del equipo de GC-MS durante 30 minutos a 250°C.

### 3.3. Protocolo de muestreo

Para la recogida de muestras de aliento exhalado, se emplearon bolsas de Tedlar de 3 litros. El protocolo de toma de muestra empleado fue el siguiente: La toma de muestra se ha de realizar en una habitación ventilada durante al menos 10 minutos. A continuación, antes del llenado de la bolsa se ha de permanecer otros 10 minutos en la habitación ventilada en reposo. Transcurrido dicho tiempo, se ha de hinchar la bolsa hasta aproximadamente un 80% del volumen de la misma. Una vez recolectado el aire exhalado se ha de girar la válvula de seguridad hacia la posición de “bloqueo” para evitar pérdidas de muestra. Para la toma de muestra, los individuos han de guardar al menos 6 horas de ayuno, solo bebiendo agua, sin lavarse los dientes (dentífricos, colutorios), sin fumar y sin tomar caramelos o chicles. Asimismo, tampoco deben utilizar lociones corporales, lápiz de labios, perfumes o cualquier sustancia que presente olor. Para su posterior estudio, las bolsas deben ser analizadas en las 6-8 horas siguientes al llenado de la bolsa.

### 3.4. Parámetros de medida en el GC-MS

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de aliento exhalado, se emplearon las condiciones descritas en la Tabla 2. Estas condiciones se escogieron en base a estudios previos realizados en el mismo equipo para aliento exhalado.

*Tabla 2. Condiciones de medida del equipo de GC-MS empleadas para el estudio de las muestras de aliento exhalado.*

Tipo de columna cromatográfica	DB-5 MS
Medidas de la columna cromatográfica	30 m x 25 mm x 0,25 µm
Inyección	Manual
Modo de inyección	Split (50 mL/min) durante la optimización de las condiciones de análisis (excepto en el estudio de la localización de la toma de muestra)
	Splitless durante el estudio de la localización de la toma de muestra y de los controles
Temperatura del inyector	250°C
Flujo del gas portador	1,5 mL/min (Helio)
Programa de temperaturas del horno	60°C (T. inicial, 1 minuto), rampa de 2°C/min hasta 300°C (T. final)
Tiempo de análisis	131 min
Energía de ionización	70 eV
Solvent delay	5 min
Modo del MS	SCAN
Rango de m/z medidas	50 - 600
Time segment	5 min
Scan time	100 ms

Por un lado, cabe destacar en el modo de inyección el empleo tanto del modo split (con división de flujo) como el splitless (sin división de flujo). Esto es debido a que, en primer lugar, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de análisis, empleándose para ello un patrón de alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>), lo cual hace que las concentraciones de los mismos se encuentren en niveles elevados. Sin embargo, en lo que respecta al estudio de los controles y el estudio comparativo de la localización de la toma de muestra donde los compuestos presentes en el aliento exhalado se

encuentran en concentraciones bajas, se hizo uso del modo splitless. Por otro lado, en lo que respecta al modo de operación del MS, en este caso se empleó el modo SCAN, el cual es útil cuando se quiere realizar un análisis cualitativo de los compuestos presentes en una muestra, concretamente en un amplio rango de masas.

### 3.5. Estudio comparativo de los compuestos presentes en el aliento

Una vez optimizadas las condiciones de análisis, se llevó a cabo un estudio comparativo entre los compuestos presentes en el aliento exhalado de 9 voluntarios que actuaron como controles. Estos se dividieron en dos grupos, tal y como muestra la Tabla 3, siendo el primero correspondiente con personas mayores de 60 años y el segundo correspondiente con personas menores de 30 años.

*Tabla 3. Datos de los individuos estudiados mediante SPME-GC-MS.*

Grupo	Control	Edad	Sexo
1	1	63	Mujer
	2	65	Hombre
	3	62	Hombre
	4	61	Hombre
2	5	24	Mujer
	6	26	Mujer
	7	24	Hombre
	8	25	Mujer
	9	24	Hombre

Cabe destacar que, si bien el objetivo inicial del trabajo consistía en realizar un estudio comparativo entre controles y pacientes con DMAE, la situación sanitaria derivada del COVID-19 supuso un impedimento a la hora de obtener muestras pertenecientes a individuos que padeciesen tal enfermedad. Este hecho, además de problemas de tiempo, ha derivado en la realización del estudio mencionado anteriormente.

Para la realización del tratamiento de datos, se empleó el software MZmine 2, que es un programa de código abierto que permite el procesamiento, visualización y análisis de datos de perfil molecular basados en espectrometría de masas.<sup>51</sup> La MS, junto a métodos de separación como la GC, se aplica comúnmente para obtener el perfil diferencial y cuantitativo de muestras biológicas en la investigación metabólica y proteómica. Así, mediante el desarrollo de mejores métodos de procesamiento de datos, se pueden descubrir nuevos biomarcadores. El desarrollo reciente del formato universal mzML para datos de MS, ha permitido solucionar los



problemas de intercambio y estandarización de los mismos, funcionando el MZmine como herramienta de trabajo eficiente.

Tras la obtención de todos los datos del equipo de GC-MS correspondientes a los 9 controles, se comenzó importando los mismos al MZmine 2 y se seleccionó la opción “Mass Detection” para obtener los espectros de masas. En dicha opción, se ajustó el tipo de detección, que en este caso es MS y no espectrometría de masas en tándem (MS/MS), la polaridad positiva, el tiempo de retención entre 5 y 131 minutos, y se seleccionó la opción “centroide”. Gracias a ella, la detección se realiza cogiendo solo el promedio de masa de cada pico para poder llevar a cabo el análisis. Para terminar esta primera parte, se ajustó el nivel de ruido a 100 cuentas y, así, el programa calculó y extrajo todas las masas.

Posteriormente, se empleó el “ADAP Chromatogram Builder”, con el objetivo de obtener los cromatogramas de cada control, que posteriormente serán deconvolucionados para obtener la información que poseen. En primer lugar, se seleccionaron los mismos filtros que se escogieron en la sección de “Mass Detection”, así como la intensidad mínima para poder observar un pico cromatográfico y que lo detecte como tal (200 cuentas), y la tolerancia de  $m/z$  en unidades absolutas que, como se trata de un cuadrupolo, se escogió 0,5; es decir, una unidad de masa completa. Después, se procedió a deconvolucionar los cromatogramas para así obtener la información relevante de los mismos, pues se alinean todos los picos situando de forma exacta cada masa con el tiempo de retención que le corresponde. Para ello, se hizo uso del algoritmo ADAP (Automated Data Analysis Pipeline), que calcula la masa  $m/z$  central utilizando la mediana, si bien también se puede usar la media. Los demás parámetros a ajustar consisten en la altura de pico mínima para que el programa tenga en consideración un compuesto (5, en este caso), y la duración del pico, que se ajustó entre 0,02 y 1,5 minutos. Finalmente, se llevó a cabo el “Hierarchical Clustering”, que se encarga “clusterizar” todos los datos tras seleccionar el tamaño del clúster (2, en este caso), la distancia mínima (tiempo) para que se considere que dos picos son iguales y la intensidad mínima.

A continuación, los cromatogramas deconvolucionados se alinearon mediante la opción “ADAP Alignment GC”, ajustando el tiempo de retención de tolerancia para que, después, el software NIST MS Search interpretase que varios picos pertenecen al mismo, así como con la masa. Consecuentemente, se obtuvo una lista que contenía todos los cromatogramas debidamente deconvolucionados y alineados, que se exportó en formato .MSP y permite al NIST MS Search generar una lista de compuestos potenciales, junto al porcentaje de probabilidad de que sean los mismos, en función del tiempo de retención y en base al espectro de fragmentación.

Para concluir, se realizó un análisis de varianza ANOVA, el cual prueba la hipótesis de si las medias de dos poblaciones son iguales. Así, se obtuvieron una serie de datos en los cuales, aquellos que posean un valor de ANOVA P menor que 0,05, serán potenciales candidatos a su identificación final con el NIST MS Search. Para terminar con el tratamiento de datos, se buscaron, en los valores de identificación dados por el NIST, aquellos compuestos que coincidan en, al menos, un 75% de concordancia.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Optimización de las condiciones de análisis

En cuanto al procedimiento de preconcentración empleando SPME, se hicieron las siguientes optimizaciones: i) selección del tipo de fibra, ii) tiempo de exposición, iii) temperatura de incubación. Para estos estudios, y sobre una muestra control de aire exhalado, se añadió un patrón de alcanos para poder seguir el efecto de las condiciones ensayadas en unos compuestos fáciles de identificar por sus tiempos de retención a lo largo del cromatograma, y cuyas intensidades únicamente van a depender de las condiciones ensayadas.

#### 4.1.1. Selección de la fibra de SPME

Para comenzar, se estudiaron 3 tipos de fibras de SPME para evaluar sus capacidades de retención con los compuestos presentes en las muestras de aliento exhalado. Las fibras estudiadas fueron: fibra de PDMS/DVB, fibra de PDMS y fibra de CAR/PDMS. Sobre la bolsa se inyectaron 50  $\mu$ L del patrón de alcanos empleando una jeringa Hamilton. La jeringa no se retiró inmediatamente si no que se mantuvo dentro de la bolsa y esta se introdujo en estufa a 37°C durante 10 minutos para asegurar una evaporación completa del patrón de alcanos. Pasado ese tiempo, se retira la jeringa y se procede a introducir el soporte con la fibra en la bolsa, se expone la fibra y se procede a la etapa de preconcentración. Para este estudio, se fijó un tiempo de exposición de 45 minutos y una temperatura de 37°C. La Figuras 10, 11 y 12 recogen los cromatogramas obtenidos con las tres fibras estudiadas:

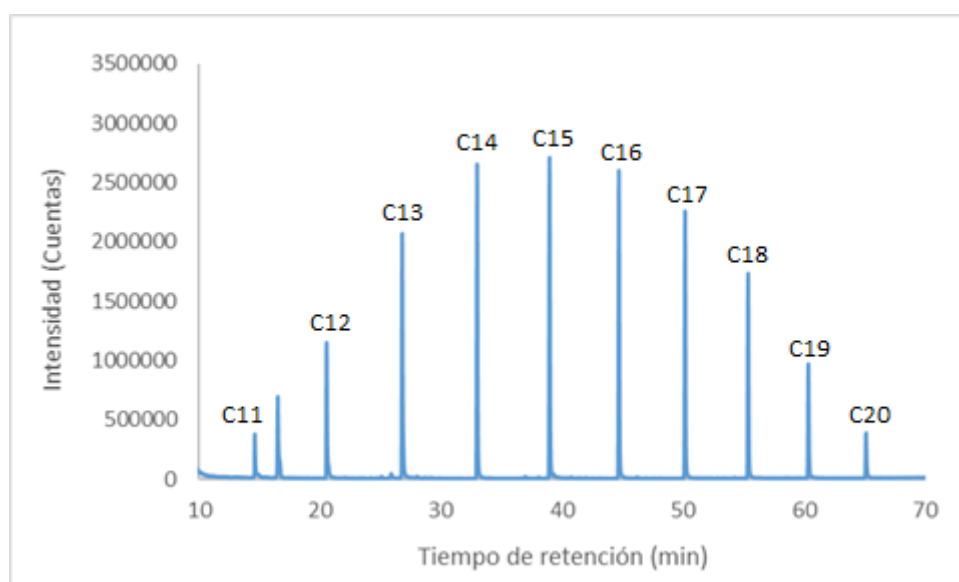


Figura 10. Cromatograma obtenido para la fibra de PDMS/DVB, ampliado en el intervalo de tiempos de retención de los alcanos presentes en el patrón (10-70 min).

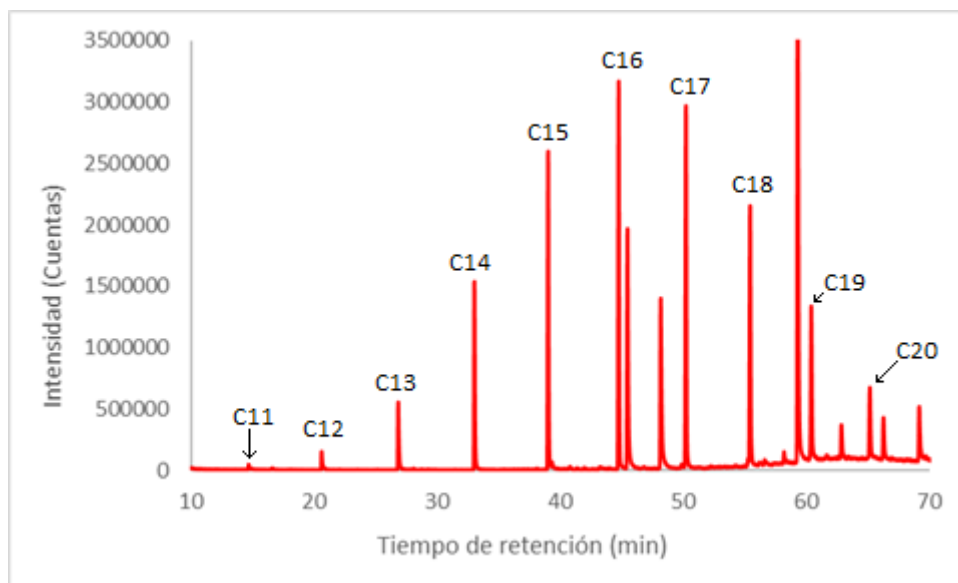


Figura 11. Cromatograma obtenido para la fibra de PDMS, ampliado en el intervalo de tiempos de retención de los alcanos presentes en el patrón (10-70 min).

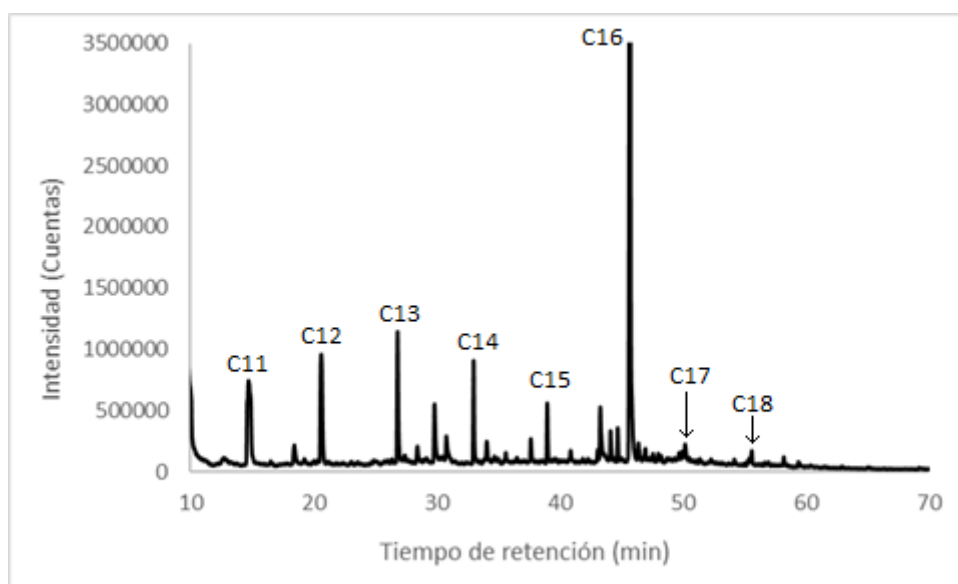


Figura 12. Cromatograma obtenido para la fibra de CAR/PDMS, ampliado en el intervalo de tiempos de retención de los alcanos presentes en el patrón (10-70 min).

La fibra de PDMS/DVB (Figura 10) y la fibra de PDMS (Figura 11) muestran un patrón de picos claro, atribuibles a los alcanos presentes en el patrón añadido, lo cual se comprobó debido a que muestran una mayor señal para los picos correspondientes a los alcanos y se corroboró mediante los valores de  $m/z$  detectados. Se puede observar que para la fibra de PMDS/DVB se ha obtenido una mayor extracción de los alcanos (mayor intensidad) en la zona central del cromatograma, reduciéndose la intensidad en los extremos. Cabe mencionar que, en el caso de esta fibra de PDMS (Figura 11), la bolsa de aliento exhalado se obtuvo en el mismo laboratorio, sin seguirse el protocolo de muestreo de apartado 3.3, de ahí que se observen grandes diferencias en los picos no debidos a los alcanos respecto a los cromatogramas obtenidos para las otras dos fibras. Sin embargo, para su estudio comparativo, se consideró igualmente correcta, pues permite identificar con claridad las señales pertenecientes a los alcanos procedentes del patrón. En el caso de la fibra de CAR/PDMS (Figura 12), esta no permite una correcta identificación de los componentes del patrón, pues su capacidad de retención para los alcanos es menor que en los otros dos casos, dando lugar consecuentemente a una intensidad de señal muy baja que no permite identificar todos los alcanos, concretamente los de mayor peso molecular. A la vista de los resultados obtenidos, se decidió continuar los estudios empleando la fibra de PDMS/DVB. Además, se llevó a cabo la identificación de los picos debidos a los alcanos añadidos en el cromatograma empleando el software del equipo GC-MS. La Figura 13 muestra el cromatograma obtenido con la fibra de PDMS/DVB y la identificación obtenida para cada pico. Se puede observar, cómo los alcanos de menor peso molecular ( $C_8$ ,  $C_9$ ,  $C_{10}$ ) no presentan señal en las condiciones de análisis empleadas. Asimismo, en la Tabla 4 se muestran los tiempos de retención de cada uno de los alcanos detectados.

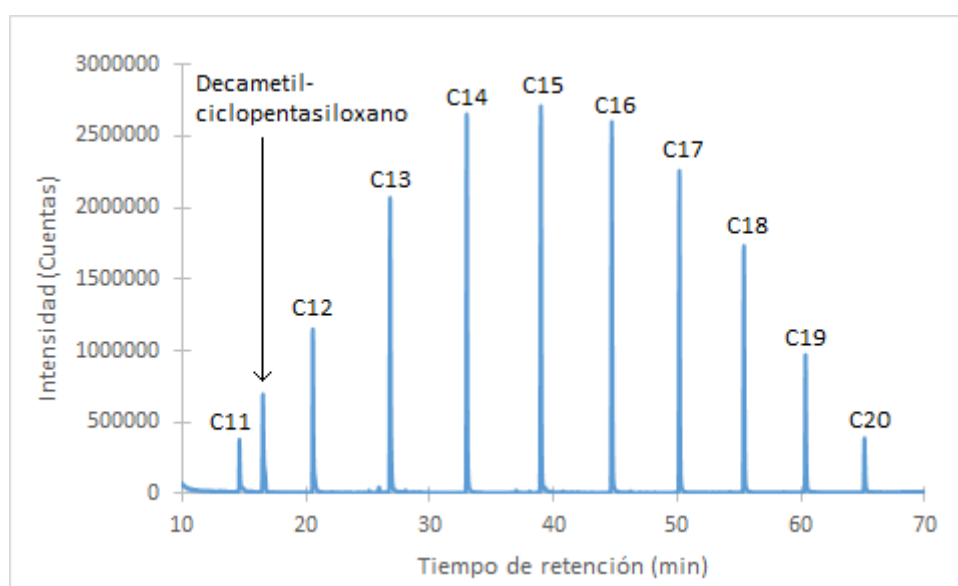


Figura 13. Identificación de los alcanos del patrón en el cromatograma obtenido con la fibra de PDMS/DVB, ampliado en el intervalo de tiempos de retención 10-70 min.

Tabla 4. Tiempos de retención de los alcanos del patrón empleado con la fibra de PDMS/DVB.

Alcano	Tiempo de retención (min)
C11	14,6
C12	20,6
C13	26,8
C14	33,0
C15	39,0
C16	44,7
C17	50,2
C18	55,4
C19	60,4
C20	65,2

#### 4.1.2. Optimización del tiempo de exposición a la fibra

Una vez seleccionada la fibra de PDMS/DVB, se procedió a optimizar el tiempo de exposición de la misma a la muestra de aire exhalado. Para ello, se seleccionaron 5 tiempos de exposición distintos: 15, 30, 45, 60 y 75 minutos, procediéndose de igual manera que en el caso anterior. De este modo, en la Figura 14 se muestra una comparación entre los intensidades de pico obtenidas a dichos tiempos de exposición para cada alcano, con el objetivo de visualizar las diferencias entre los mismos en función de los tiempos.

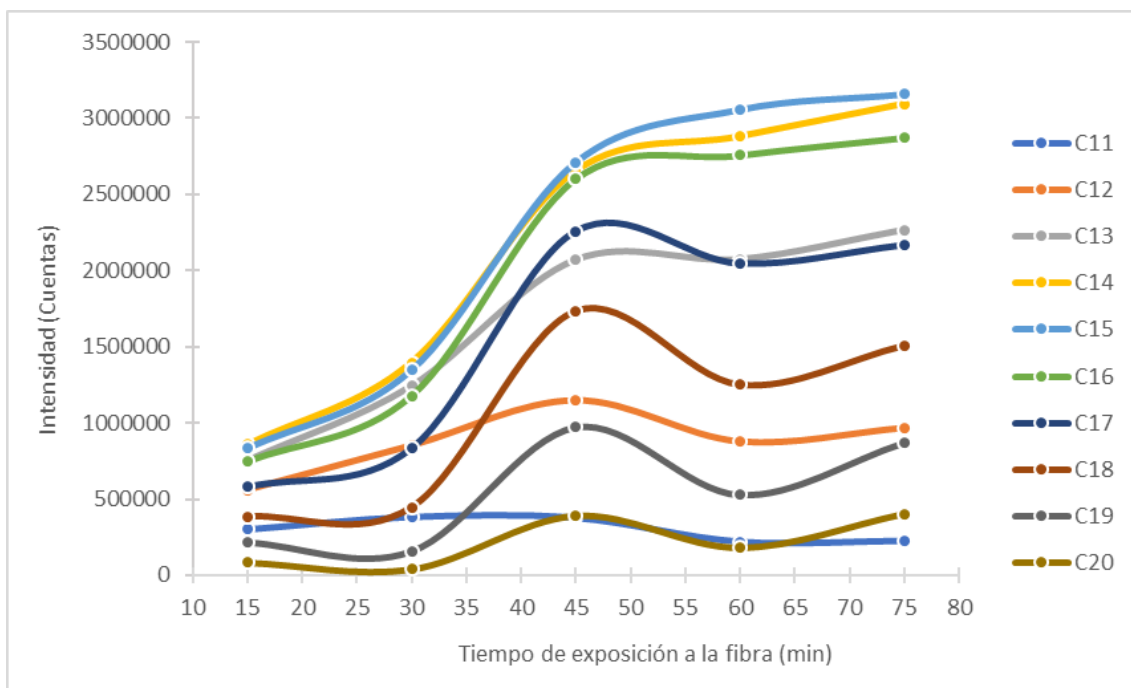


Figura 14. Representación gráfica de la variación en la intensidad de los picos cromatográficos de cada alcano en función del tiempo de exposición a la fibra, con la estufa a 37°C.

A la vista de los resultados obtenidos, la intensidad de los picos cromatográficos aumenta de forma destacada al aumentar el tiempo de exposición desde los 15 a los 45 minutos. A partir de este tiempo, se observa un ligero aumento en la altura de los picos centrales del cromatograma, correspondientes con los alcanos C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>16</sub>, mientras que, en el caso de las señales correspondientes con los alcanos C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub> y C<sub>20</sub>, se observó que la mayor intensidad de pico se consiguió a los 45 minutos de exposición de la fibra. Ante estos resultados, se escogieron los 45 minutos como tiempo de exposición a la fibra, pues de este modo, se consigue optimizar el tiempo de análisis del método, obteniéndose igualmente buenos resultados.

#### 4.1.3. Optimización de la temperatura de exposición a la fibra

El siguiente paso consistió en estudiar el efecto de la temperatura de exposición a la fibra sobre el grado de preconcentración de los alcanos en la fibra. Las temperaturas de la estufa estudiadas fueron 25, 30 y 37°C, y en la Figura 15 se muestra una comparación entre las intensidades de pico obtenidas a dichas temperaturas para cada alcano.

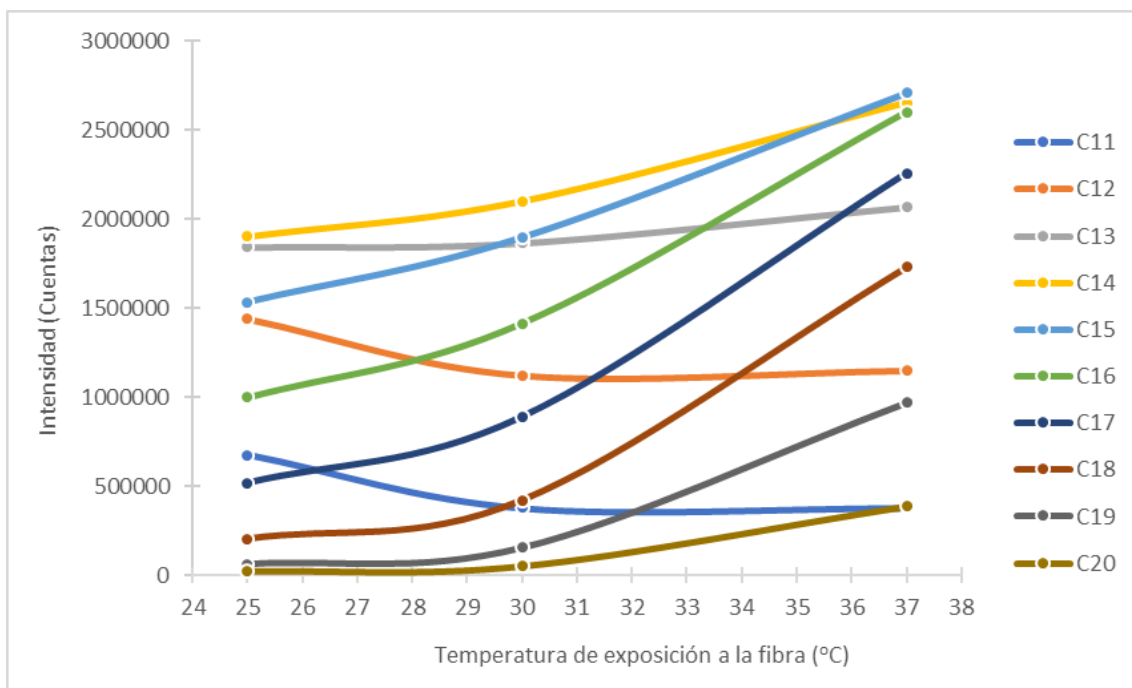


Figura 15. Representación gráfica de la variación en la intensidad de los picos cromatográficos de cada alcano en función de la temperatura de exposición a la fibra de PDMS/DVB, con un tiempo de exposición de 45 min.

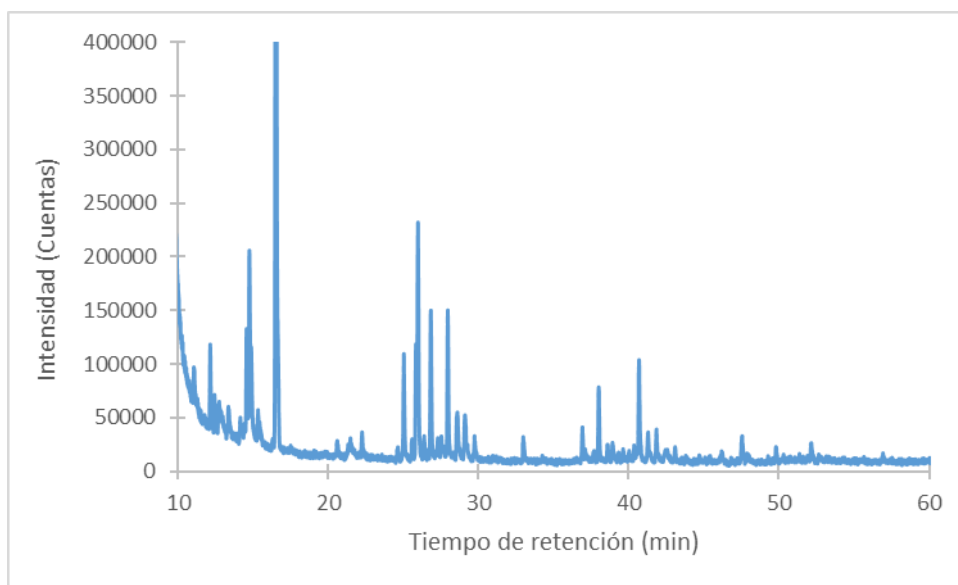
Observando la figura anterior, se concluye que los picos correspondientes a los alcanos más ligeros (C<sub>11</sub>-C<sub>12</sub>) presentan una mayor intensidad al disminuir la temperatura de incubación, mientras que, desde el C<sub>13</sub> hasta el C<sub>20</sub>, este orden se invierte, aumentando el grado de preconcentración en la fibra cuando la temperatura de incubación es mayor. A 37°C, la intensidad observada para todos los alcanos presentes en el cromatograma fue suficiente para su correcta identificación, mientras que, a 25°C y 30°C, la intensidad que presentan los alcanos pesados C<sub>19</sub> y C<sub>20</sub> es insuficiente. Cabe destacar también que se realizó una prueba a una temperatura superior (40°C), pero la bolsa no soportó el aumento de presión experimentado. Asimismo, otro rasgo a tener en cuenta consiste en que la contaminación procedente de la bolsa puede aumentar conforme se incrementa la temperatura. Por todo ello, como temperatura óptima de exposición de la fibra, se escogió 37°C, pues permite una correcta identificación de todo el rango de alcanos estudiados.

#### 4.1.4. Estudio de los fondos en función de la localización de toma de muestra

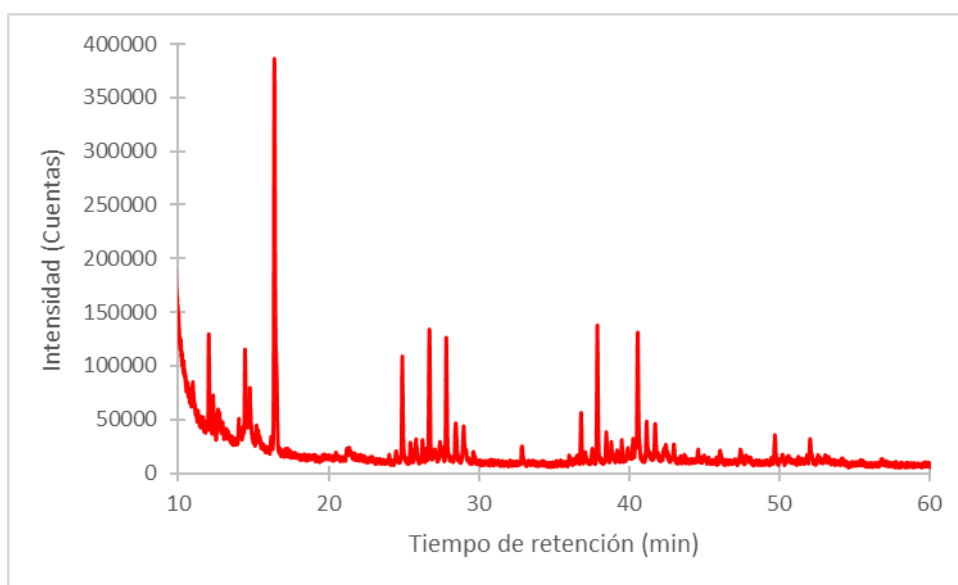
Dado que el objetivo final es el análisis de aire exhalado de distintos individuos (controles y pacientes) para la búsqueda de posibles marcadores de DMAE, se he evaluado el efecto que tendría la ubicación en la que se realiza el llenado de la bolsa sobre el perfil de picos del cromatograma. De esta forma, si se comprueba que la ubicación no afecta de manera importante al cromatograma obtenido, sería más sencillo encontrar voluntarios para el estudio,



ya que la toma de muestra podrían realizarla en su domicilio particular sin comprometer la viabilidad del trabajo. Así, se analizaron dos muestras de aire exhalado del mismo voluntario, tomadas el mismo día, en dos localizaciones diferentes (domicilio particular y un despacho en la Facultad de Química). Tras seguir el procedimiento correspondiente, en esta ocasión sin emplear el patrón de alcanos, se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en las Figuras 16 y 17, en las cuales se ha realizado una ampliación en la zona en la que se pudieron observar picos pertenecientes al aliento exhalado.



*Figura 16. Ampliación del cromatograma obtenido con la fibra PDMS/DVB entre 10 y 60 minutos, cuyo muestreo se realizó en un domicilio particular.*



*Figura 17. Ampliación del cromatograma obtenido con la fibra PDMS/DVB entre 10 y 60 minutos, cuyo muestreo se realizó en un despacho de la Facultad de Química.*

A la vista de los resultados obtenidos, la localización en la que se realiza la toma de muestra es poco relevante, pues los dos cromatogramas muestran perfiles muy similares en los que las diferencias observadas se deben únicamente a los compuestos que desprende la bolsa Tedlar, no perteneciendo los mismos al aliento estudiado. Por ello, teniendo en cuenta que en el resto de los casos estudiados se realice el protocolo detallado anteriormente, con una correcta ventilación de la habitación en la que se tome la muestra, se concluyó que la toma de muestra se puede realizar directamente en el domicilio, facilitando de este modo el trabajo posterior.

#### 4.2. Estudio comparativo de los compuestos presentes en el aliento

Tras el tratamiento de los resultados obtenidos a partir de las muestras de los 9 individuos que sirvieron como controles, el análisis ANOVA proporcionó los datos que se muestran en la Tabla 5.

*Tabla 5. Datos obtenidos a partir del análisis ANOVA.*

<i>m/z</i>	Tiempo de retención (min)	Valor p
90,9	46,0	0,0042
207,8	94,5	0,0088
93,9	44,6	0,0143
208,8	77,8	0,0199
206,9	80,1	0,0202
65,9	18,3	0,0283
207,9	103,8	0,0370
206,9	87,7	0,0405
208,8	84,2	0,0411
206,9	97,1	0,0459
208,9	118,0	0,0476
71,0	25,9	0,0480

En la Tabla 5 se recogen únicamente los datos que registraron un valor de p menor de 0,05, pues es el dato en el que se fija el valor de significación estadística; los 12 picos representan compuestos que presentan suficientes diferencias entre poblaciones y se pueden utilizar para agrupar y discriminar mediante análisis multivariante entre las poblaciones estudiadas. Seguidamente, estos 12 picos fueron analizados utilizando el software NIST MS Search; este permite comparar los resultados obtenidos por GC-MS con las vasta base de datos del NIST. Tomando como valor límite un valor de 75% de concordancia, se lograron identificar 3 compuestos (resaltados sus datos en verde en la Tabla 5). En la Tabla 6 se recogen la información correspondiente a dichos compuestos identificados.

Tabla 6. Compuestos identificados a partir del tratamiento de datos con el NIST MS Search.

$m/z$	Tiempo de retención (min)	Valor de Concordancia (%)	Nombre	Fórmula molecular
208,8	77,8	78,3	Trimetilnitrosourea	$C_4H_9N_3O_2$
206,9	80,1	80,7	3-metil-5-(1-metiletil)-fenolmetilcarbamato	$C_{12}H_{17}NO_2$
206,9	87,7	76,6	N-(2-metoxifenil)-3-oxo-butanamida	$C_{11}H_{13}NO_3$
206,9	97,1	79,0	N-(2-metoxifenil)-3-oxo-butanamida	$C_{11}H_{13}NO_3$

Asimismo, en las Figuras 18, 19 y 20 se muestran los espectros de masas correspondientes a cada uno de los 3 compuestos identificados con el software NIST MS Search, junto a sus estructuras moleculares.

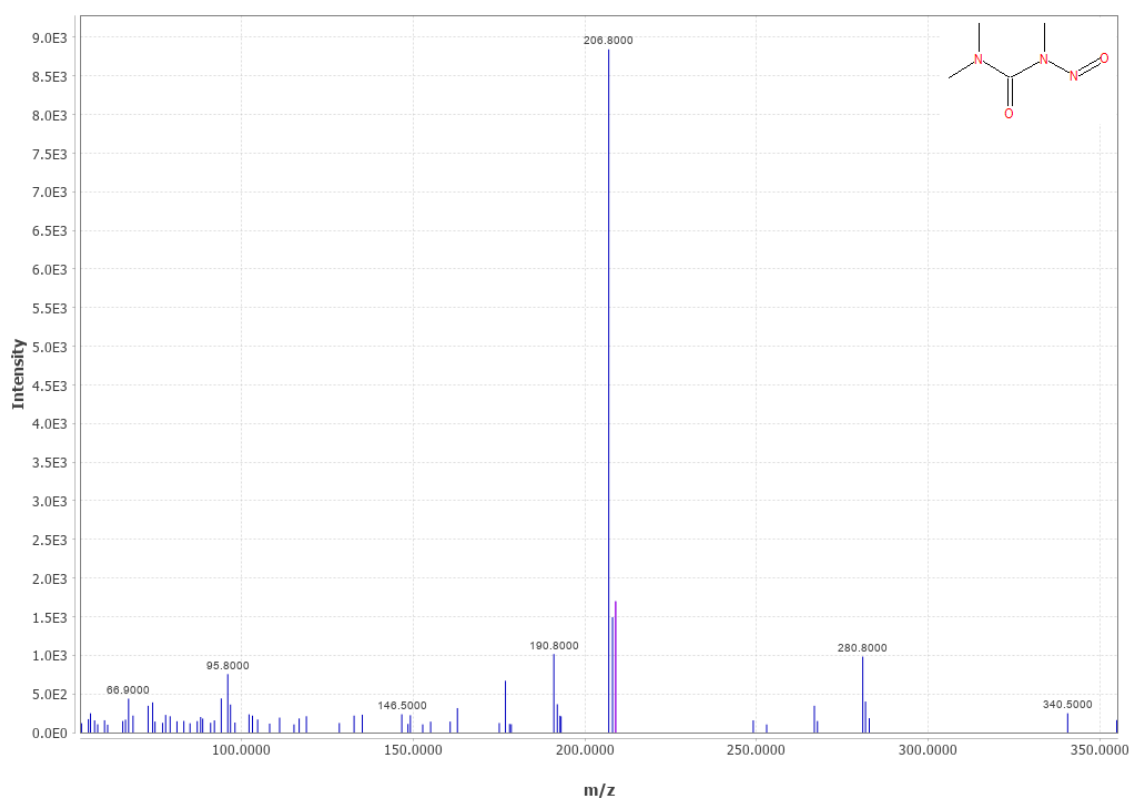


Figura 18. Espectro de MS y estructura molecular de la trimetilnitrosourea ( $C_4H_9N_3O_2$ ).

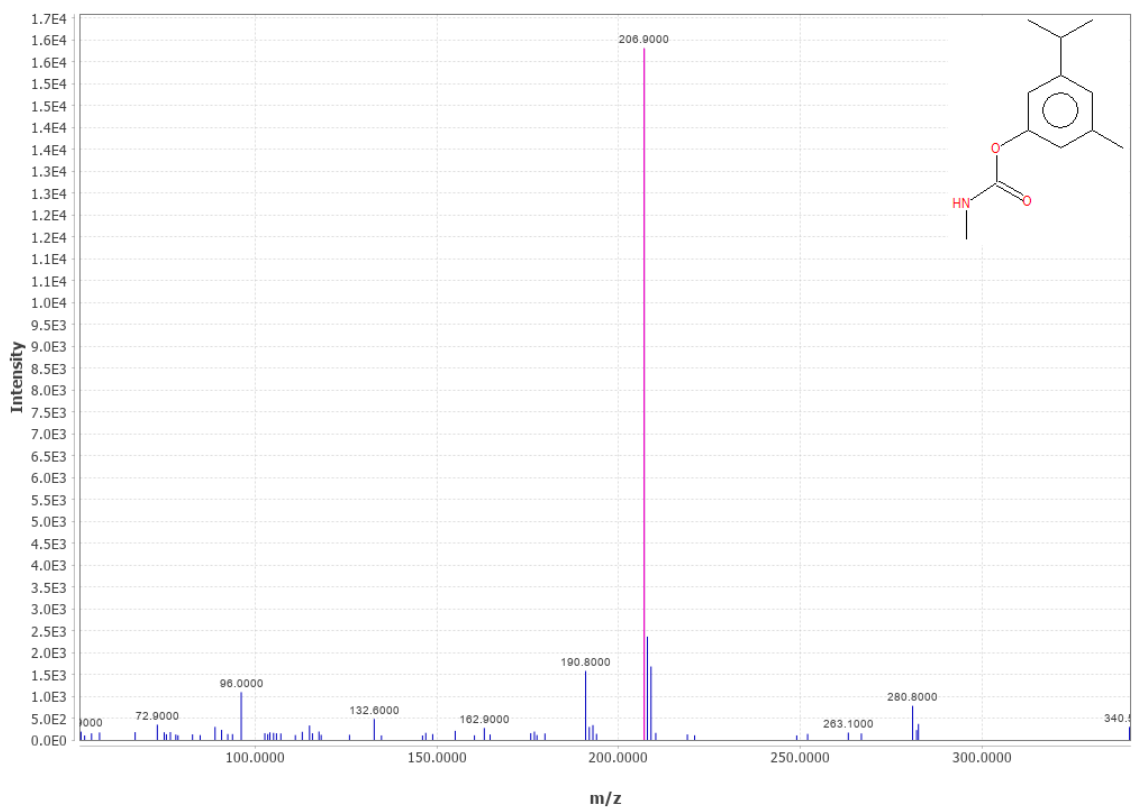


Figura 19. Espectro de MS y estructura molecular de la 3-metil-5-(1-metiletil)-fenolmetilcarbamato ( $C_{12}H_{17}NO_2$ ).

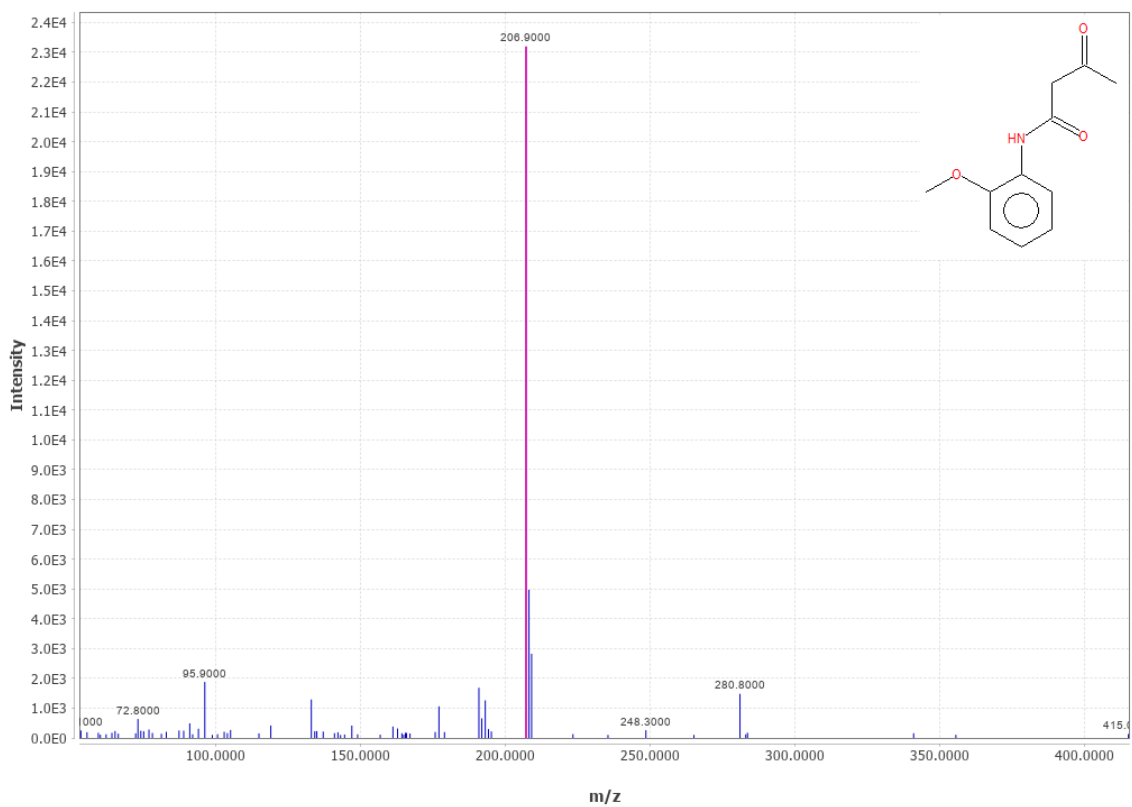


Figura 20. Espectro de MS y estructura molecular de la N-(2-metoxifenil)-3-oxo-butanamida ( $C_{11}H_{13}NO_3$ ).

Sin embargo, a pesar de la identificación de los 3 compuestos anteriormente descritos, los valores de p asignados revelan una baja capacidad de discriminación. A su vez el análisis de componentes principales no mostró ningún agrupamiento, concluyéndose de este modo que no se hallaron diferencias significativas en el patrón de distribución de VOCs en aliento exhalado entre los dos grupos de edad. Aun así, se debe destacar que, debido a la falta de tiempo para la realización del presente trabajo, la muestra de controles obtenida fue pequeña, con lo que sería necesario, a partir de la base estudiada en este TFM, realizar un estudio más extenso, con más muestras y un mayor tiempo de análisis, para así poder probar con diferentes parámetros en el tratamiento de datos. Asimismo, la obtención de muestras de pacientes con DMAE permitiría concluir con el objetivo inicial de este estudio.

## 5. Conclusiones

- Se ha desarrollado de forma satisfactoria un método para el muestreo y análisis de VOCs en aliento basado en SPME-GC-MS. El muestreo se lleva a cabo empleando bolsas Tedlar de 3 L en el domicilio del individuo. La preconcentración de las muestras se optimizó concluyéndose que la fibra de SPME óptima es de PDMS/DVB, el tiempo de exposición de la muestra a la fibra es de 45 minutos y la temperatura de incubación es de 37°C.
- La ubicación para la toma de muestra es irrelevante si se sigue el protocolo de muestreo indicado. Por ello, es fundamental realizar una correcta ventilación de la habitación en la que se lleve a cabo.
- El método desarrollado se probó con 9 individuos que ejercieron de controles, divididos en dos grupos (4 pertenecientes al grupo de mayores de 60 años y 5 del grupo de menores de 30 años). Tras la aplicación de una serie de herramientas estadísticas para la identificación de VOCs característicos de ambos grupos, se concluyó la presencia de 3 compuestos característicos en el aliento exhalado con potencial discriminante entre los dos grupos: trimetilnitrosourea ( $C_4H_9N_3O_2$ ), 3-metil-5-(1-metiletil)-fenolmetilcarbamato ( $C_{12}H_{17}NO_2$ ) y N-(2-metoxifenil)-3-oxo-butanamida ( $C_{11}H_{13}NO_3$ ). La baja población estudiada o las pequeñas diferencias en términos de intensidad pueden ser las causantes de la incapacidad de diferenciación entre los grupos.
- A pesar de la identificación de los 3 compuestos, estos no presentan diferencias significativas en el patrón de VOCs en aliento exhalado entre ambos. Sin embargo, al tratarse de una muestra de tan solo 9 individuos, sería necesario realizar un estudio más extenso, con más individuos y un mayor tiempo de análisis.
- No fue posible aplicar este método para la búsqueda de biomarcadores de DMAE. No obstante, el método desarrollado en el presente trabajo puede servir de base para llevar a cabo estudios futuros relacionados con la enfermedad.

## 6. Bibliografía

- [1] Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., & Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 2(2), e106-e116. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(13)70145-1)
- [2] Hou, X. W., Wang, Y. & Pan, C. W. (2020). Metabolomics in age-related macular degeneration: a systematic review. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(14), 13. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.14.13>
- [3] Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G., & Wong, T. Y. (2012). Age-related macular degeneration. *The Lancet*, 379(9827), 1728–1738. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)60282-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)60282-7)
- [4] Nguyen, K.H., Patel, B.C., Tadi, P. (2020) Anatomy, Head and Neck, Eye Retina. *StatPearls Publishing*. [En línea] Recuperado 10 de junio de 2021 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542332/>
- [5] Nowak, J. Z. (2006). Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacological reports*, 58(3), 353.
- [6] Jager, R. D., Mieler, W. F., & Miller, J. W. (2008). Age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 358(24), 2606–2617. <https://doi.org/10.1056/nejmra0801537>
- [7] Cottle, R., Neima, D., Pollock, C., Mackenzie, P., Rajagopalan, S., & Iovieno, A. (2018). The Retina. [En línea] Recuperado 10 de junio de 2021, de <https://www.newwesteyes.net/retinainfo>
- [8] Mettu, P. S., Wielgus, A. R., Ong, S. S., & Cousins, S. W. (2012). Retinal pigment epithelium response to oxidant injury in the pathogenesis of early age-related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(4), 376–398. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.04.006>
- [9] Cook, H. L., Patel, P. J., & Tufail, A. (2008). Age-related macular degeneration: diagnosis and management. *British Medical Bulletin*, 85(1), 127–149. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn012>
- [10] Instituto Oftalmológico de Granada (2018). Degeneración macular: causas y tratamiento. [En línea] Recuperado 22 de junio de 2021, de <https://www.iogranada.com/degeneracion-macular/>

- [11] Damián, J., Pastor, R., Armadá, F., & Arias, L. (2006). Epidemiología de la degeneración macular asociada con la edad. Situación en España. *Atención Primaria*, 38(1), 51–57. <https://doi.org/10.1157/13090016>
- [12] Al-Zamil, W., & Yassin, S. (2017). Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clinical Interventions in Aging, Volume 12*, 1313–1330. <https://doi.org/10.2147/cia.s143508>
- [13] Lambert, N. G., ElShelmani, H., Singh, M. K., Mansergh, F. C., Wride, M. A., Padilla, M., Ambati, B. K. (2016). Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 54, 64–102. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.04.003>
- [14] Kersten, E., Paun, C. C., Schellevis, R. L., Hoyng, C. B., Delcourt, C., Lengyel, I., Jong, E. K. (2018). Systemic and ocular fluid compounds as potential biomarkers in age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 63(1), 9–39. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.05.003>
- [15] Han, G., Wei, P., He, M., Teng, H., & Chu, Y. (2020). Metabolomic profiling of the aqueous humor in patients with wet Age-Related Macular Degeneration using UHPLC–MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 19(6), 2358–2366. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00036>
- [16] Brown, C., Green, B., Thompson, R., den Hollander, A., & Lengyel, I. (2018). Metabolomics and Age-Related Macular Degeneration. *Metabolites*, 9(1), 4. <https://doi.org/10.3390/metabo9010004>
- [17] Laíns, I., Duarte, D., Barros, A. S., Martins, A. S., Carneiro, T. J., Gil, J. Q., . . . Gil, A. M. (2019). Urine Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Metabolomics in Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Proteome Research*, 18(3), 1278–1288. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00877>
- [18] Laíns, I., Chung, W., Kelly, R. S., Gil, J., Marques, M., Barreto, P., Murta, J. N., Kim, I. K., Vavvas, D. G., Miller, J. B., Silva, R., Lasky-Su, J., Liang, L., Miller, J. W., & Husain, D. (2019). Human plasma metabolomics in Age-Related Macular Degeneration: Meta-Analysis of two cohorts. *Metabolites*, 9(7), 127. <https://doi.org/10.3390/metabo9070127>
- [19] Laíns, I., Kelly, R. S., Miller, J. B., Silva, R., Vavvas, D. G., Kim, I. K., Husain, D. (2018). Human Plasma Metabolomics Study across All Stages of Age-Related Macular Degeneration Identifies Potential Lipid Biomarkers. *Ophthalmology*, 125(2), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.08.008>



- [20] Luo, D., Deng, T., Yuan, W., Deng, H., & Jin, M. (2017). Plasma metabolomic study in Chinese patients with wet age-related macular degeneration. *BMC Ophthalmology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12886-017-0555-7>
- [21] Chao De La Barca, J. M., Rondet-Courbis, B., Ferré, M., Muller, J., Buisset, A., Leruez, S., Reynier, P. (2020). A Plasma Metabolomic Profiling of Exudative Age-Related Macular Degeneration Showing Carnosine and Mitochondrial Deficiencies. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 631. <https://doi.org/10.3390/jcm9030631>
- [22] Acar, L. E., Lores-Motta, L., Colijn, J. M., Meester-Smoor, M. A., Verzijden, T., Cougnard-Gregoire, A., . . . Zumbansen, M. (2020). Integrating Metabolomics, Genomics, and Disease Pathways in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 127(12), 1693–1709. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.06.020>
- [23] Liu, K., Fang, J., Jin, J., Zhu, S., Xu, X., Xu, Y., Xu, X. (2019). Serum Metabolomics Reveals Personalized Metabolic Patterns for Macular Neovascular Disease Patient Stratification. *Journal of Proteome Research*, 19(2), 699–707. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00574>
- [24] Amann, A., & Smith, D. (2013). *Volatile biomarkers: Non-invasive diagnosis in physiology and medicine* (1.<sup>a</sup> ed.) 129–131. <https://doi.org/10.1016/B978-0-44-0-462613-4.00008-8>
- [25] Bouza, M., Gonzalez-Soto, J., Pereiro, R., de Vicente, J. C., & Sanz-Medel, A. (2017). Exhaled breath and oral cavity VOCs as potential biomarkers in oral cancer patients. *Journal of Breath Research*, 11(1), 016015. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa5e76>
- [26] Tisch, U., Schlesinger, I., Ionescu, R., Nassar, M., Axelrod, N., Robertman, D., Haick, H. (2013). Detection of Alzheimer’s and Parkinson’s disease from exhaled breath using nanomaterial-based sensors. *Nanomedicine*, 8(1), 43–56. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.105>
- [27] Subramaniam, N. S., Bawden, C., Waldvogel, H., Faull, R., Howarth, G., & Snell, R. (2018). Emergence of breath testing as a new non-invasive diagnostic modality for neurodegenerative diseases. *Brain Research*, 1691, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.017>
- [28] Lau, H. C., Yu, J. B., Lee, H. W., Huh, J. S., & Lim, J. O. (2017). Investigation of exhaled breath samples from patients with Alzheimer’s disease using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and an exhaled breath sensor system. *Sensors*, 17(8), 1783. <https://doi.org/10.3390/s17081783>
- [29] Hunt J. (2007). Exhaled breath condensate: an overview. *Immunology and allergy clinics of North America*, 27(4), 587–v. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2007.09.001>

- [30] Mochalski, P., King, J., Unterkofler, K., & Amann, A. (2013). Stability of selected volatile breath constituents in Tedlar, Kynar and Flexfilm sampling bags. *The Analyst*, *138*(5), 1405. <https://doi.org/10.1039/c2an36193k>
- [31] Mochalski, P., Wzorek, B., Śliwka, I., & Amann, A. (2009). Suitability of different polymer bags for storage of volatile sulphur compounds relevant to breath analysis. *Journal of Chromatography B*, *877*(3), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.003>
- [32] Amann, A., & Smith, D. (2013). *Volatile biomarkers: Non-invasive diagnosis in physiology and medicine* (1.<sup>a</sup> ed.) 156–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-44-0-462613-4.00008-8>
- [33] Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, *880*(1–2), 35–62. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00309-5)
- [34] Lee, J., Hwang, S., Lee, D., Heo, G. S., (2002) Determination of volatile organic compounds (VOCs) using Tedlar bag/Solid-phase Microextraction/Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME/GC/MS) in ambient and workplace air. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *23*(3), 488–496. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.3.488>
- [35] Llompart, M., Li, K., & Fingas, M. (1998). Solid-Phase Microextraction and Headspace Solid-Phase Microextraction for the Determination of Polychlorinated Biphenyls in Water Samples. *Analytical Chemistry*, *70*(13), 2510–2515. <https://doi.org/10.1021/ac971332y>
- [36] Potter, D. W., & Pawliszyn, J. (1994). Rapid determination of polyaromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in water using solid-phase microextraction and GC/MS. *Environmental Science & Technology*, *28*(2), 298–305. <https://doi.org/10.1021/es00051a017>
- [37] Determination of Volatile Organic Compounds (VOCs) Using Tedlar Bag/Solid-phase Microextraction/Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME/GC/MS) in Ambient and Workplace Air. (2002b). *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *23*(3), 488–496. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.3.488>
- [38] Determination of Volatile Organic Compounds (VOCs) Using Tedlar Bag/Solid-phase Microextraction/Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME/GC/MS) in Ambient and Workplace Air. (2002c). *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *23*(3), 488–496. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.3.488>
- [39] García, R. A., Morales, V., Martín, S., Vilches, E., & Toledano, A. (2013). Volatile organic compounds analysis in breath air in healthy volunteers and patients suffering

- epidermoid laryngeal carcinomas. *Chromatographia*, 77(5–6), 501–509.  
<https://doi.org/10.1007/s10337-013-2611-7>
- [40] Kim, K. H., Jahan, S. A., & Kabir, E. (2012). A review of breath analysis for diagnosis of human health. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.09.013>
- [41] McCurdy, M. R., Bakhirkin, Y., Wysocki, G., Lewicki, R., & Tittel, F. K. (2007). Recent advances of laser-spectroscopy-based techniques for applications in breath analysis. *Journal of Breath Research*, 1(1), 014001. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/1/1/014001>
- [42] Saidi, T., Zaim, O., Moufid, M., el Bari, N., Ionescu, R., & Bouchikhi, B. (2018). Exhaled breath analysis using electronic nose and gas chromatography–mass spectrometry for non-invasive diagnosis of chronic kidney disease, diabetes mellitus and healthy subjects. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 257, 178–188.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.178>
- [43] Karasek, F. W., & Clement, R. E. (2012). *Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques*. Elsevier.
- [44] Cayman Chemical. (2021). Analytical Techniques. [En línea] Recuperado 26 de junio de 2021, de <https://www.caymanchem.com/news/analytical-techniques>
- [45] Sneddon, J., Masuram, S., & Richert, J. C. (2007). Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. *Analytical Letters*, 40(6), 1003–1012.  
<https://doi.org/10.1080/00032710701300648>
- [46] Niessen, W. M. A. (2001). Principles and Instrumentation of Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, 1.
- [47] Harvey, D. J. (2018). Mass spectrometry - Ionization methods overview. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Published.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14221-0>
- [48] Gushue, J. N. (2013). Principles and Applications of Gas Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Advanced Techniques in Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS–MS and GC–TOF–MS) for Environmental Chemistry*, 255–270.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-62623-3.00011-3>
- [49] NIST (National Institute of Standards and Technology). (2021). Mass Spectrometry Data Center. [En línea] Recuperado 10 de julio de 2021, de <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:downloads:start>

- [50] Kyle, P. (2017). Toxicology: GCMS. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, 131–163. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800871-3.00007-9>
- [51] Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>