

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de un sistema de percepción sensorial artificial  
para la detección del cáncer gástrico en el aliento exhalado**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Aylen Lisset Jaimes Mogollón**

**Directores**

**José Santiago Torrecilla Velasco**  
**Septimiu Radu Ionescu**  
**Cristhian Manuel Durán Acevedo**

**Madrid**

**© Aylen Lisset Jaimes Mogollón, 2020**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de un sistema de percepción sensorial artificial  
para la detección del cáncer gástrico en el aliento exhalado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Aylen Lisset Jaimes Mogollón**

DIRECTOR

José Santiago Torrecilla Velasco  
Septimiu Radu Ionescu  
Cristhian Manuel Durán Acevedo





*A mis amores Olinda, Cruz Delina y Mercedes,*

*forjadoras de mi camino.*

*A mi familia fuente de fortaleza.*

*A los amigos por la luz encendida en mi corazón.*

*Y a ti Dios amor y razón de todo.*





## AGRADECIMIENTOS



---

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quiero dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte durante todo el periodo de estudio.

Al PhD. José Santiago Torrecilla Velasco, tutor y director, por integrarme en su equipo de trabajo, por su apoyo en mi formación doctoral y por sus aportes para la terminación de mi tesis.

Al PhD. Septimiu Radu Ionescu, por su dirección, interés, paciencia, enseñanzas, entrega, aportes y valiosos consejos en mi actividad investigadora que me permitieron alcanzar los objetivos del proyecto y culminar esta etapa de vital importancia para mi desarrollo profesional y personal.

A los PhD. Cristhian Durán y Oscar Gualdrón, por su guía desde mi país Colombia y por su confianza en mí para ser merecedora de esta oportunidad.

Al Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia, dependencia GASTROSUR S.A.S. en especial al Dr. Gastroenterólogo Julián David Martínez Marín y a su asistente Dayla Liliana Pérez Bernal, por su entusiasta colaboración en el reclutamiento de pacientes y la recolección de muestras de aliento, por su asistencia técnica y académica que durante meses me brindaron para lograr una estancia fructífera y productiva como parte esencial de mi tesis.

Al PhD. Raúl Calavia (URV) y al PhD. Tesfalem Geremariam Welearegay, por los aportes significativos para el desarrollo del sistema multisensorial.

A la PhD. Rosa Ras (URV) y Florina Ionescu por su orientación y conocimientos compartidos sobre el proceso de análisis GC-MS e identificación de biomarcadores.

Al Instituto de Química Macromolecular “Petru Poni”, Iasi, Rumania, en especial a Mihai Brebu y su equipo de trabajo, por alojarme en su laboratorio durante mi estancia de investigación, por el aprendizaje y por el tiempo para lograr la finalización de mi tesis.

Al Grupo de Investigación de Sistemas Multisensoriales de la Universidad de Pamplona, Colombia, por brindarme un espacio para escalar los primeros peldaños de la investigación, particularmente a mis colegas Juan Cáceres y Kelvin Beleño, por su ayuda.

A la Universidad de Pamplona y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, Colombia, por su respaldo académico y financiero como Joven Doctorando y a la Comisión Europea en el marco de los proyectos EU-TROPSENSE y bTB-Test por la subvención de mis estancias de investigación.

A la Universidad Complutense de Madrid, por aceptarme dentro de su selecto grupo de estudiantes doctorales.

A todas las personas del extranjero que me acogieron en sus corazones y me hicieron sentir en familia durante el tiempo que estuve lejos de Colombia.

A mi mamá y a toda mi familia, que, sin importar la distancia, siempre me han motivado y apoyado para seguir y levantarme cada vez que sentí decaer, a ellos quienes nunca han perdido la ilusión y la esperanza de verme conquistar nuevos escenarios.

A las personas que mantienen encendida la llama de mi corazón a través del tiempo, para alcanzar cada meta que me propongo en la vida.

A todas y cada una de las personas que me animaron en este camino, soportando y comprendiendo con estoica paciencia la dedicación que requiere la realización de una tesis doctoral.

Muchas gracias a todos.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	18

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

<b>1.1</b> Enfermedades no transmisibles .....	22
<b>1.2</b> El cáncer de estómago .....	24
<b>1.3</b> El aire exhalado .....	26
<b>1.4</b> Biomarcadores de enfermedades en el aire exhalado.....	32
<b>1.5</b> Conclusiones.....	33

## **CAPÍTULO 2**

### **ANÁLISIS DEL ALIENTO EXHALADO**

<b>2.1</b> Muestreo del aliento exhalado .....	36
<b>2.1.1</b> Dispositivos de muestreo .....	36
<b>2.1.2</b> Almacenamiento de los compuestos volátiles exhalados.....	40
<b>2.2</b> Técnicas analíticas de análisis .....	44
<b>2.3</b> Sistemas de olfato electrónico .....	47

2.3.1 Sensores químicos de gases .....	50
2.3.2 Análisis de señales y reconocimiento de patrones .....	53
2.4 Conclusiones .....	57

## **CAPÍTULO 3**

### **ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

3.1 Medición de las muestras.....	60
3.2 Cromatogramas .....	62
3.3 Procesamiento de datos cromatográficos .....	68
3.4 Biomarcadores .....	69
3.5 Conclusiones.....	72

## **CAPÍTULO 4**

### **DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA MULTISENSORIAL**

4.1 Descripción general .....	76
4.2 Fabricación de los materiales sensibles de los sensores.....	77
4.3 Caracterización de los sensores y operación del sistema multisensorial .....	82
4.4 Pruebas iniciales .....	85
4.4.1 Evaluación del almacenamiento de las muestras .....	86
4.4.2 Discriminación entre fumadores y no fumadores.....	88
4.5 Conclusiones.....	92

## **CAPÍTULO 5**

### **DIAGNÓSTICO DE CÁNCER GÁSTRICO MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL ALIENTO EXHALADO**

<b>5.1</b> Pacientes y toma de muestras .....	96
<b>5.2</b> Análisis cromatográfico .....	101
<b>5.3</b> Análisis con el sistema de sensores de gases .....	117
<b>5.4</b> Conclusiones .....	126

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIONES**

Conclusiones .....	130
Conclusions .....	133

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	138
---------------------------	-----

<b>ABREVIACIONES</b> .....	152
----------------------------	-----

### **PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA**

Publicaciones .....	154
Conferencias .....	155



## RESUMEN



---

## RESUMEN

El **cáncer gástrico** continúa posesionándose como una de las neoplasias malignas más mortales en el mundo, especialmente en regiones menos desarrolladas como América Latina. Pese a la tendencia global de querer un descenso en las tasas de mortalidad por cáncer gástrico, en Colombia la enfermedad todavía representa una gran problemática social.

Uno de los principales inconvenientes es que, debido a la inexistencia en la actualidad de un método de cribado apropiado para la población en riesgo, la mayor parte de los casos son diagnosticados en un estadio avanzado, cuando el pronóstico es devastador. La enfermedad es generalmente letal cuando se detecta clínicamente, ya que en la mayoría de los casos se diagnostica cuando el tumor ha invadido la capa muscular del estómago. No obstante, cuando el tumor se descubre en fase inicial, la tasa de supervivencia a 5 años puede superar el 90%.

Ante esta perspectiva, este trabajo doctoral tuvo como objetivo investigar la idoneidad de una estrategia apropiada para la detección temprana de cáncer gástrico a través de un método rápido y asequible económicamente, basado en una metodología no invasiva, de fácil uso y manejo para el pre-diagnóstico rápido del cáncer gástrico a través del análisis de muestras de aliento exhalado.

El estudio se realizó en una cohorte de pacientes atendidos por distintas enfermedades gástricas en el Hospital Universitario de la Samaritana de Bogotá, Colombia. Se incluyeron pacientes diagnosticados con cáncer gástrico y pacientes diagnosticados con otras enfermedades gástricas, los cuales formaron el grupo de control.

## Resumen

Inicialmente se efectuó una búsqueda en el estado del arte para seleccionar el dispositivo de muestreo y el contenedor de almacenamiento de las muestras de aliento más idóneos para la investigación planteada. Tras este análisis, se seleccionaron el muestreador de aliento BioVOC™ y los tubos de almacenamiento de vidrio con material absorbente Tenax TA (ORBO™ 420), los cuales se emplearon para la recolección y el almacenamiento de las muestras adquiridas en este estudio.

Una vez recolectadas las muestras, en la primera etapa del trabajo experimental se usó la técnica de *cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas* para identificar, por un lado, los compuestos orgánicos volátiles más abundantes en el aliento de todos los pacientes, y por otro lado para determinar posibles biomarcadores de cáncer gástrico hallados en niveles estadísticamente diferentes entre pacientes con cáncer gástrico y pacientes con otras enfermedades gástricas. En total se encontraron hasta 650 compuestos orgánicos volátiles en el aliento de los voluntarios, que pertenecen a los grupos de compuestos químicos de los alquenos, alcanos, alquilos, compuestos aromáticos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y ácidos. Para hallar los posibles biomarcadores del cáncer gástrico, se utilizó el test estadístico t de Student con el valor de corte  $\alpha = 0,05$ , y se encontraron cinco posibles biomarcadores de cáncer gástrico: *trans-2,2-dimetil-3-deceno*, *m-xileno*, *octadecano*, *hexadecano* y *1-ciclohexil-2-(ciclohexilmetil)pentano*.

Fundamentado en esta información, en la segunda etapa del trabajo experimental se desarrolló un *sistema de olfato electrónico* formado por una matriz de sensores químicos de gases basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con distintos compuestos orgánicos, fabricados mediante una tecnología innovadora que usa la técnica de deposición en fase de gas avanzada, la cual permite la síntesis de nanomateriales de alta pureza. La morfología de los nanomateriales fabricados, caracterizada por microscopía electrónica de barrido, indicó la formación de monocapas de nanopartículas de oro enlazadas mediante los compuestos orgánicos.

## Resumen

Para la medición de las muestras de aliento con el sistema de olfato electrónico, los sensores fueron incorporados en una cámara de medidas cerrada de bajo volumen. Primero se efectuaron pruebas iniciales con este sistema multisensorial para determinar el comportamiento de los sensores ante muestras reales y evaluar el tiempo idóneo de almacenamiento de éstas en el dispositivo de muestreo previamente seleccionado, determinándose en esta fase que las muestras deben ser analizadas de inmediato tras la recolección para evitarse la pérdida de compuestos orgánicos volátiles.

A continuación se investigó la posibilidad de discriminar muestras de aliento de diferentes clases de sujetos con el sistema multisensorial desarrollado en este trabajo, para lo cual se seleccionaron voluntarios fumadores y no fumadores. El modelo de clasificación no supervisado PCA construido con los parámetros extraídos de las respuestas de los sensores a las muestras analizadas indicó una clasificación excelente entre los voluntarios fumadores, no fumadores, y el aire ambiente.

Una vez estudiada esta etapa, para la fase final se analizaron con el sistema multisensorial las muestras de aliento de los dos grupos de pacientes incluidos en este proyecto, y se construyó un modelo de clasificación no supervisado PCA con los parámetros extraídos de las respuestas sensoriales, el cual produjo una tasa de acierto de 97% en la discriminación de los pacientes con cáncer gástrico, estando a la par con la precisión de la prueba de endoscopia que representa el procedimiento de diagnóstico estándar actual para cáncer gástrico.

Adicionalmente, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos en este estudio y resultados obtenidos en otros estudios efectuados en poblaciones del Este de Asia y Países Bálticos de Europa, que además de Sudamérica presentan la mayor incidencia global de cáncer gástrico, para determinar si factores asociados a diferencias genéticas, de alimentación y estilo de vida pueden tener impacto sobre la metabolómica de la enfermedad del cáncer gástrico.



**ABSTRACT**



---

**ABSTRACT**

*Gastric cancer* continues to be one of the most lethal neoplasia in the World, especially in less developed regions such as Latin America. Besides of the global tendency searching for the decrease of the mortality rate produced by gastric cancer, in Colombia this illness still represents a high social problem.

One of the most important drawbacks is that, because of the current unavailability of a suitable screening method for the risk population, most of the cases are diagnosed when the prognosis is devastating. This disease is generally lethal when it is clinically detected, because in the majority of the cases it is diagnosed when the tumor already invaded the stomach wall. However, when the tumor is detected at an incipient stage, the 5 years survival rate can be over 90%.

In front of this perspective, the objective of this doctoral thesis was to investigate the suitability of an alternative strategy for the early detection of gastric cancer through a fast and economically affordable method, based on a non-invasive and ease of use methodology, for the fast prediagnosis of gastric cancer through the analysis of exhaled breath samples.

The study was realized on a cohort of patients diagnosed with gastric diseases attended at the University Hospital Samaritana from Bogotá, Colombia. In the study there were included patients diagnosed with gastric cancer, and patients diagnosed with other gastric diseases that formed the controls group.

At first, it was realized a state of the art search in order to select the most suitable breath samples acquisition and storing devices for the purpose of the present study. Based on the literature search, there were finally selected the BioVOC™ breath sampler and the glass storage tube with Tenax TA storing material (ORBO™ 420), which were

## Abstract

further employed for the collection and storage of the breath samples acquired in this study.

Once the samples acquired, in the first stage of the experimental work it was employed the *gas chromatography coupled to mass spectrometry* technique in order to identify, on one hand, the most abundant volatile organic compounds in the breath of all patients, and on the other hand to determine possible breath biomarkers of gastric cancer disease, as the compounds found in statistically different levels in the breath of the patients diagnosed with gastric cancer and the patients with other gastric diseases. Totally there were found up to 650 volatile organic compounds in volunteers' breath, which belong to the chemical groups of alkenes, alkanes, alkyls, aromatic compounds, esters, ethers, aldehydes and acids. For identifying the possible breath biomarkers of gastric cancer, it was applied the statistical Student t test with the cut-off value  $\alpha = 0.05$ , and were found five possible gastric cancer biomarkers: *trans-2,2-dimethyl-3-decene*, *m-xylene*, *octadecane*, *hexadecane* and *1-cyclohexyl-2-(cyclohexylmethyl)pentane*.

Based on this information, in the second stage of the experimental work it was developed an *electronic olfaction system* composed of an array of chemical gas sensors based on gold nanoparticles functionalized with different organic compounds, fabricated through an innovative methodology that employs the advanced gas deposition technique, and allows for the synthesis of ultra-pure nanomaterials. The morphology of the sensing nanomaterials, characterized by surface electronic microscopy studies, revealed the fabrication of monolayers of gold nanoparticles linked by the organic compounds.

For the measurement of the breath samples with the electronic nose system, the sensors were placed inside a closed small-volume measurement chamber. At first, there were performed initial tests with the sensors system in order to assess sensors responses to real breath samples and to evaluate the adequate storage time of the breath samples in the sampling device, which led to the conclusion that the samples

## Abstract

need to be analyzed immediately after collection for avoiding the leakage of compounds.

Next, it was investigated the possibility to discriminate between breath samples of different classes of subjects with the sensors system developed in this study. For this experiment there were selected various smoker and nonsmoker volunteers. The PCA classification model built with the features extracted from sensors responses to the breath samples analyzed revealed an excellent discrimination between the smoking volunteers, nonsmoking volunteers, and environmental air.

Once realized these studies, in the last stage of the project there were measured with the sensors system the breath samples of the patients with gastric diseases selected for the present study. The PCA classification model built with the features extracted from sensors responses yielded 97% accuracy for the discrimination of the gastric cancer patients, which is on pair with the accuracy of the endoscopy test that represents the current standard diagnostic method for gastric cancer.

Additionally, it was realized a comparison between the results obtained in this study and the results obtained in other studies performed on populations from East Asia and Baltic European Countries, which besides of South America present the highest incidence of gastric cancer in the World, and it was determined that factors associated with genetic, alimentation and lifestyle differences can have an impact on the metabolomics of the gastric cancer disease.



## CAPÍTULO 1

---

### INTRODUCCIÓN



## 1.1 ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES

Las enfermedades no transmisibles (ENT) se posicionan como la principal causa de muerte a nivel mundial, ya que provocan más defunciones que todas las demás causas juntas, y afectan más a las poblaciones de ingresos bajos y medios. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los principales tipos de ENT son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes, las cuales podrían reducirse de manera significativa combatiendo los factores de riesgo y aplicando la detección precoz y los tratamientos oportunos, con lo que se salvarían millones de vidas y se evitarían sufrimientos indecibles [1]. De los 56,4 millones de defunciones registradas en el mundo en 2016, más de la mitad (el 54%) fueron consecuencia de las 10 causas que se indican a continuación (figura 1.1) [2].

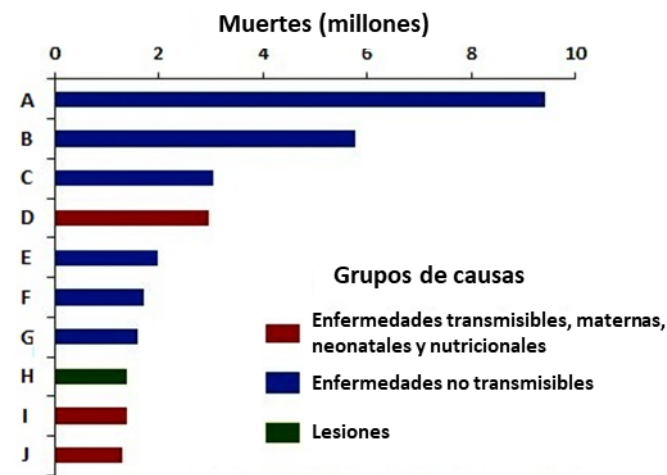
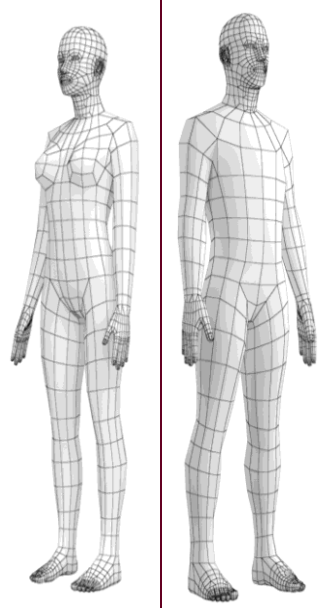


Figura 1.1 Muertes globales causadas por categorías de enfermedades. (A) Enfermedad isquémica del corazón (B) Infarto (C) Enfermedad pulmonar crónica obstructiva (D) Infección de las vías respiratorias (E) Enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (F) Tráquea, bronquios, cánceres de estómago, pecho, colon, pulmón (G) Diabetes mellitus (H) Accidentes de tráfico (I) Enfermedades diarreicas (J) Tuberculosis. Adaptado de [2].

Con el aumento del impacto de las ENT y el envejecimiento de la población, se prevé que el número de muertes por ENT en el mundo, especialmente por *cáncer*, seguirá ascendiendo cada año a un ritmo más acelerado que el promedio [1]. En regiones menos

desarrolladas, como América Latina, donde el diagnóstico precoz y el acceso al tratamiento son más difíciles, el escenario es aún más grave: el número de casos crecerá un 78% en los próximos 21 años, llegando a los 2,5 millones anuales, y las muertes por cáncer prácticamente se duplicarán, llegando a 1,3 millones de fallecimientos cada año. En Colombia se pronostica que se duplicarán los fallecimientos por esta causa para 2040 [3]. Según cifras reportadas en el año 2018 por la OMS (tabla 1.1) [3], en Colombia entre los hombres la mortalidad por cáncer fue encabezada por los tumores malignos del estómago (3.444), seguido por próstata (3.166), pulmón (2.971), colon (2.203), leucemia (1.200), hígado (1.156) y páncreas (996). Entre las mujeres el cáncer de pecho (mama) fue la primera causa de muerte (3.702), seguido por el cáncer de colon (2.286), pulmón (2.265), estómago (2.061), cuello uterino (1.775), ovario (1.252) y páncreas (1.146).

Tabla 1.1 Número de muertes estimado en mujeres y en hombres, Colombia 2018. Adaptado de [3].

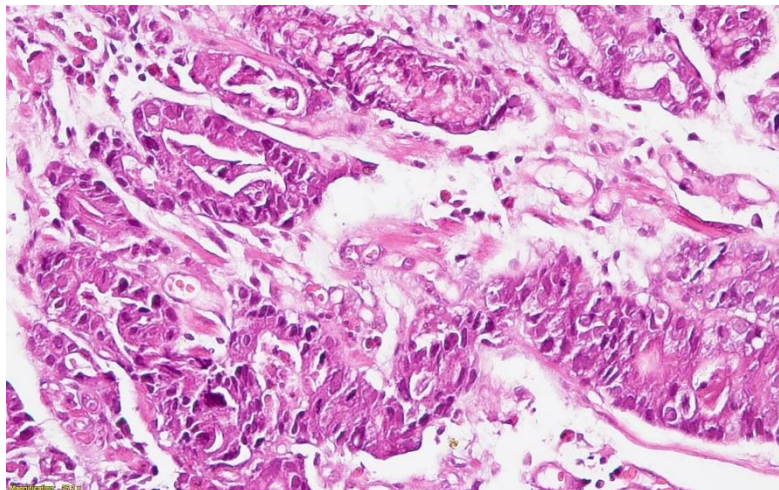
Tipos de cánceres	Número de muertes	Porcentaje (%)	Mujeres	Hombres	Tipos de cánceres	Número de muertes	Porcentaje (%)
<b>Pecho</b>	3702	15.9			<b>Estómago</b>	3444	15.1
<b>Colon</b>	2286	9.8			<b>Próstata</b>	3166	13.9
<b>Pulmón</b>	2265	9.7			<b>Pulmón</b>	2971	13.1
<b>Estómago</b>	2061	8.8			<b>Colon</b>	2203	9.7
<b>Cuello Uterino</b>	1775	7.6			<b>Leucemia</b>	1200	5.3
<b>Ovario</b>	1252	5.4			<b>Hígado</b>	1156	5.1
<b>Páncreas</b>	1146	4.9			<b>Páncreas</b>	996	4.4
<b>Otros</b>	8829	37.9			<b>Otros</b>	7605	33.4
<b>TOTAL</b>	<b>23316</b>	<b>100</b>			<b>TOTAL</b>	<b>22741</b>	<b>100</b>

Es así, como se evidencia que el *cáncer de estómago* es uno de los más letales en Colombia y su problemática radica principalmente en la detección y diagnóstico tardío, lo que dificulta obtener un resultado óptimo en el posible tratamiento.

---

## 1.2 EL CÁNCER DE ESTÓMAGO

El cáncer de estómago (gástrico) (CG) es una enfermedad que forma células malignas (cancerosas) en el revestimiento del estómago [4]. La pared del estómago está compuesta principalmente por las capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa, las cuales son importantes para determinar la etapa (extensión) del cáncer y para establecer un pronóstico en una persona. El cáncer de estómago se origina en la primera capa (mucosa), y por su origen en el tejido glandular de ésta. El 95% de los casos de CG son del tipo denominado *adenocarcinoma* (figura 1.2).



---

Figura 1.2 Cáncer de estómago, micrografía ligera. Sección de tejido de un adenocarcinoma gástrico. Las células cancerosas (púrpura) pueden verse proliferando. Reproducido de [5].

---

En ocasiones, el cáncer se denomina solo *carcinoma* o *carcinoma indiferenciado*; esto significa que el tumor se ha “indiferenciado” perdiendo su “arquitectura” glandular. Los

*linfomas, los sarcomas, los melanomas y los tumores del estroma gastrointestinal* son otros tipos de cáncer mucho menos frecuentes y por esa razón, su diagnóstico y tratamientos son diferentes [6].

El cáncer de estómago se puede propagar de varias maneras; éste puede crecer a través de la pared del estómago e invadir los órganos cercanos. También puede propagarse a los vasos linfáticos y a los ganglios linfáticos adyacentes. Cuando el cáncer de estómago se torna más avanzado, puede desplazarse a través del torrente sanguíneo y propagarse (metástasis) a órganos como el hígado, los pulmones y los huesos [7].

El CG es multicausal, y en su etiología participan factores endógenos y exógenos con potencial para desencadenar respuestas anormales en las células o interferir en sus procesos normales de proliferación [8]. Entre los factores de riesgo más representativos se encuentra el consumo excesivo de sal y alimentos ahumados, el hábito de fumar, abuso de consumo de alcohol, la infección con *Helicobacter pylori*, las condiciones ambientales, y los factores ocupacionales. No obstante, hay que señalar que, debido a su lenta progresión, la posibilidad de ser diagnosticado con CG aumenta drásticamente después de los 50 años (aunque el diagnóstico tardío podría desempeñar un papel importante aquí) [9].

En el CG no hay sintomatología específica, y el 90% de los pacientes no presentan síntomas de alarma [10]. Se estima que el 25% de los casos presenta dispepsia ulcerosa con dolor postprandial recurrente que no responde a las medidas terapéuticas simples, habituales, no farmacológicas [11], mientras el 50% de los pacientes puede presentar pérdida de peso, astenia, vómitos, saciedad precoz, entre otros.

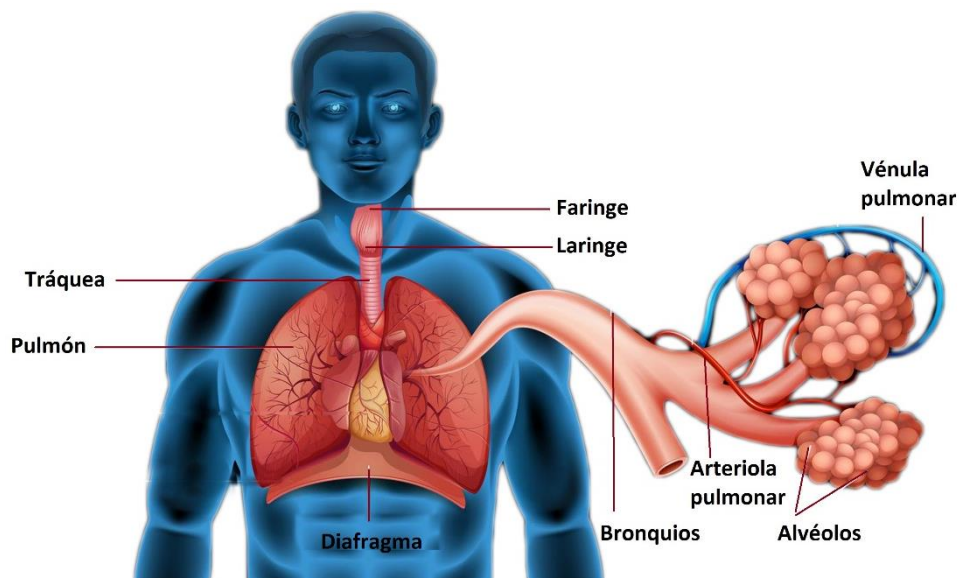
Existen varios métodos que se utilizan para ayudar a diagnosticar el cáncer gástrico, entre los que se puede destacar principalmente la esofagogastroduodenoscopia (endoscopia) con biopsia, además del examen coprológico y hemogramas [12]. En la actualidad, las pruebas de endoscopia y biopsia son las más usadas para determinar esta

enfermedad, pero aún son procedimientos que requieren tiempo para obtener los resultados, son incómodos para los pacientes y además costosos. Como consecuencia de ello se presenta la necesidad del uso de métodos alternativos que coadyuven a su diagnóstico.

---

### 1.3 EL AIRE EXHALADO

El mecanismo de respiración ocurre cuando el aire entra por la nariz y pasa a la cavidad nasal. Luego sigue por la faringe y la laringe hasta la tráquea y llega a los bronquios. De ahí se distribuye por los pulmones hasta el final de las ramificaciones, donde el oxígeno se difunde a la sangre, y el dióxido de carbono pasa a los alvéolos. Finalmente, el aire es expulsado cuando los músculos respiratorios se relajan (figura 1.3).



---

Figura 1.3 Mecanismo de respiración. Adaptado de [6].

El análisis del aire exhalado ha sido propuesto como un posible método no invasivo de diagnóstico desde los tiempos de la Antigua Grecia [13]. Los primeros estudios científicos de análisis de aire exhalado datan de los años 70, pero es en la década de los 2000 cuando surgen con gran fuerza. En el año 1971, Pauling et al. [14], identificaron más de 250 compuestos presentes en el aire exhalado de varios voluntarios, y a partir de esa fecha muchos han sido los estudios que han relacionado estas sustancias con diferentes enfermedades. De Lacy Costello et al. [15], han creado un compendio de compuestos volátiles reportados que se emanan del cuerpo humano, observando 872 compuestos relacionados con la respiración. Otros estudios informan que la respiración contiene más de 1000 compuestos [16].

La composición del aliento exhalado está constituida por nitrógeno (74%), oxígeno (21%), pequeños gases inorgánicos como NO, H<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> (que representan casi el 5%), vapor de agua y trazas de más de mil compuestos orgánicos volátiles (COV) y compuestos orgánicos no volátiles [17, 18]. Los COV son detectados y medidos directamente en la respiración, mientras que los compuestos orgánicos no volátiles (p. ej., isoprostanos, peroxinitritos o citoquinas) se producen en el aliento exhalado como partículas de aerosol y se miden en el condensado de la respiración.

La mayoría de los COV en el aliento están presentes en concentraciones muy bajas que van desde partes por trillón (ppt) a partes por millón (ppm) [19]. En particular, la cantidad total de estos COV no representa más de 100 ppm del volumen respiratorio total [20]. Los compuestos orgánicos volátiles alcanzan la respiración exhalada desde las partes más profundas de los pulmones llamadas alvéolos, como resultado del proceso de intercambio con la sangre, por lo tanto, se encuentran en el llamado "aliento alveolar" [21, 22].

Los COV se originan a partir de exposiciones ambientales actuales o anteriores (*compuestos exógenos*) y por la producción interna metabólica (anabólica y catabólica) (*compuestos endógenos*). Los COV endógenos tienden a ser menos reactivos que los

COV exógenos y tienen una tendencia mucho menor a ser almacenados en los compartimientos de grasa del cuerpo debido a su mayor volatilidad. Los COV endógenos también tienen una mayor tendencia a disolverse en la sangre debido a una mayor polaridad, lo que facilita su transporte a través de la sangre a los pulmones y su liberación a través de la exhalación [23].

- COV endógenos

Los tipos y orígenes de los COV endógenos en la respiración humana son importantes para determinar las fuentes y los posibles efectos negativos asociados con su presencia en el cuerpo; éstos pueden llevar a la localización de los efectos patógenos en órganos específicos o compartimientos corporales, y a determinar la gravedad del desarrollo de una enfermedad o el progreso de la enfermedad a lo largo del tiempo. De esta manera, las mediciones repetidas de estos compuestos en la respiración a lo largo del tiempo pueden indicar la fase de desarrollo de la enfermedad y la duración de la presencia de la enfermedad en el cuerpo.

Los compuestos endógenos que se usan comúnmente con fines de diagnóstico son hidrocarburos como el etano, el pentano y el isopreno; compuestos que contienen oxígeno como acetona, acetaldehído, metanol, etanol y 2-propanol; compuestos que contienen azufre como dimetilsulfuro, metilo y etil mercaptanos; y disulfuro de carbono y sustancias que contienen nitrógeno, como amoníaco y dimetil/trimetilamina. Para evaluar el significado fisiológico y el potencial de diagnóstico de estas sustancias, deben conocerse sus vías bioquímicas de generación. La tabla 1.2 muestra varias clases de COV endógenos exhalados en el aliento y sus mecanismos de producción.

Tabla 1.2 Clases de compuestos orgánicos volátiles endógenos en el aliento. Adaptado de [24].

Clases de COV	Ejemplo	Ejemplo de mecanismo de producción
Hidrocarburos saturados	Etano, pentano, aldehídos	Peroxidación lipídica de los componentes de ácidos grasos de las membranas celulares activada por especies reactivas de oxígeno
Hidrocarburos insaturados	Isopreno	Vía mevalónica de la síntesis de colesterol
Contienen oxígeno	Acetona	Descarboxilación del acetoacetato de la lipólisis o la peroxidación lipídica
Contienen azufre	Etilmercaptano, dimetilsulfuro	Metabolismo incompleto de la metionina
Contienen nitrógeno	Dimetilamina, amoníaco	Insuficiencia hepática y uremia

Los estudios in vitro han demostrado que el etano y el pentano se generan cuando los cultivos celulares se exponen a especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, estos hidrocarburos alifáticos se consideran marcadores in vitro e in vivo de la peroxidación lipídica. Además, los niveles de pentano y etano exhalados se correlacionan bien con otros marcadores de peroxidación de lípidos como malondialdehído, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o glutatión reducido [25]. Aunque existen otras fuentes potenciales de hidrocarburos saturados en el cuerpo, como la oxidación de proteínas y el metabolismo bacteriano del colon, aparentemente tienen una importancia limitada y no interfieren con la interpretación de la prueba de aliento de hidrocarburos para el etano y el pentano [26]. Por lo tanto, se pueden usar las concentraciones exhaladas de etano y n-pentano para controlar el grado de daño oxidativo en el cuerpo [27, 28].

El isopreno es un hidrocarburo insaturado que está siempre presente en el aliento humano. La formación de unidades isoprenoides se produce por la pérdida de CO<sub>2</sub> (citoplasma), y se cree que se forma a lo largo de la vía mevalónica de la síntesis de colesterol [29], aunque una pequeña fracción del isopreno exhalado puede ser de origen bacteriano [30]. Existe evidencia experimental de que la exhalación de isopreno puede estar relacionada con el daño oxidativo en el revestimiento líquido del pulmón [31] y en el cuerpo [32]. Las concentraciones de isopreno en la respiración también parecen ser dependientes de la edad, siendo significativamente menores en los niños.

La acetona es uno de los compuestos más abundantes en el aliento humano. La acetona se forma por descarboxilación del acetoacetato, que se deriva de la lipólisis o la peroxidación lipídica. Los cuerpos cetónicos como la acetona se oxidan a través del ciclo de Krebs en el tejido periférico, y en sujetos cetonémicos en tiempos de ayuno o de hambre o durante la dieta.

El acetaldehído se produce probablemente por oxidación de etanol endógeno, y las concentraciones de acetaldehído en la respiración son siempre más bajas que las correspondientes concentraciones de etanol. Por su parte, las concentraciones de etanol en el aliento de sujetos humanos son mucho más altas después de la ingesta de alcohol, el etanol siendo indicador del consumo de alcohol. La fuente potencial de etanol endógeno es la flora bacteriana intestinal [33]. Por otro lado, se postula que el 2-propanol es un producto de una reducción de acetona mediada por enzimas, y sus concentraciones en los seres humanos son siempre más bajas que las concentraciones de acetona [34]. En cuanto al metanol, su origen en el aliento humano también puede ser la flora bacteriana intestinal.

Los compuestos que contienen azufre se generan en humanos por un metabolismo incompleto de la metionina en la vía de transaminación [35]. Los mercaptanos se oxidan fácilmente a sus respectivos sulfuros. En condiciones normales, las concentraciones de compuestos que contienen azufre en la sangre humana y la respiración son muy bajas, pero el deterioro de la función hepática aumenta el nivel de compuestos que contienen azufre.

El olor característico de la respiración urémica debido a niveles elevados de dimetilamina y trimetilamina se conoce desde hace mucho tiempo. En 1977, las aminas se identificaron de forma concluyente y se cuantificaron en el aliento humano [36]. En la sangre aparecen niveles significativos de amoníaco si la eliminación del amoníaco a través de la conversión a urea es limitada debido a un deterioro de la función hepática.

- COV exógenos

Los COV exógenos detectados en el aliento humano han recibido también mucho interés, ya que la presencia de estos compuestos puede indicar la exposición previa de un individuo a sustancias tóxicas y posibles carcinógenos. Dado que los COV exógenos son potencialmente indicadores directos de exposición a agentes químicos causantes de enfermedades (toxinas, gases nocivos o tóxicos, etc.), su detección implica la posibilidad de que se hayan producido efectos adversos en el cuerpo humano, no solo en forma de enfermedades, sino también daños físicos en los órganos que pueden provocar disfunciones o fallos en los órganos, trastornos metabólicos y daños importantes en los tejidos de los pulmones, cerebro y sistemas orgánicos, particularmente los sistemas circulatorio y nervioso.

No obstante, la presencia de COV exógenos en la respiración no indica necesariamente la presencia de enfermedad, sino más bien proporciona pistas de que la enfermedad o el daño a los órganos es más probable y puede estar presente. Por lo tanto, las personas que están expuestas a estas sustancias tienen un mayor riesgo de incidencia de la enfermedad.

Existe una gran variedad de gases exógenos en el aire ambiente que se absorbe por inhalación, absorción por la piel y por ingestión. Los COV exógenos pueden originarse a partir de una variedad de fuentes, tales como incendios en edificios, contaminación del aire relacionada con la industria y el transporte, efluentes de aire municipales contaminantes, derrames químicos tóxicos, así como contaminantes naturales como dióxido de azufre y sulfuro de hidrógeno que provienen de fuentes geotérmicas (volcanes, aguas termales y géiseres), pantanos y ciénagas eutróficas y minas abiertas a la atmósfera. Estos COV se consideran altamente reactivos y suelen causar daños peroxidativos al ADN, a las proteínas y a los ácidos grasos poliinsaturados [23]. Los

impactos negativos de los COV exógenos en el cuerpo pueden acumularse durante muchos años y provocar enfermedades crónicas y cáncer [37].

Una vez que los COV tóxicos lipofílicos exógenos se inhalan y pasan de los pulmones al sistema circulatorio, pueden almacenarse dentro de los compartimientos de grasa del cuerpo y finalmente liberarse para causar daño y enfermedad durante semanas o meses después de la exposición inicial [38].

---

#### **1.4 BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES EN EL AIRE EXHALADO**

Por lo general, independientemente de su origen, una sustancia volátil exhalada cuyas concentraciones difirieron significativamente entre los grupos de sujetos sanos y no sanos analizados, se ha identificado como posible biomarcador de la enfermedad investigada [39].

Los biomarcadores del aire exhalado reflejan los cambios metabólicos producidos por la enfermedad y pueden representar signos prodrómicos que permiten un diagnóstico temprano o permiten determinar el resultado de interés en una etapa más primicia de la enfermedad. Estos biomarcadores se pueden utilizar como un indicador de un factor biológico que representa una manifestación subclínica, una etapa del trastorno o una manifestación de la enfermedad.

El origen y la composición de los COV endógenos en el aliento son útiles para la identificación de biomarcadores preclínicos de diversas enfermedades, reflejando las alteraciones que tienen lugar en el metabolismo [40]. Por lo tanto, la medición de COV endógenos en la respiración puede proporcionar una ventana a los procesos bioquímicos del cuerpo.

Algunos contaminantes ambientales, incluidos los hidrocarburos como el octano, el decano y los derivados del benceno conocidos comúnmente como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno, xileno), también se han considerado biomarcadores de enfermedades [39, 41]. Es probable sin embargo que estos patrones de COV exógenos en el aliento exhalado se deriven de la exposición corporal a los COV contaminantes que se absorben en el cuerpo, los cuales fueron exhalados de nuevo por la inhalación de los mismos. Por lo cual la exposición a estos compuestos debe investigarse y tomarse en cuenta para asegurarse de que no indican más bien la exposición humana a ambientes contaminantes.

Además de los compuestos volátiles orgánicos, los compuestos volátiles inorgánicos pequeños como el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO), se han identificado como biomarcadores importantes para enfermedades respiratorias específicas como el asma [42, 43].

No obstante, no se puede acertar considerando que un biomarcador por sí solo es suficiente para establecer un diagnóstico definitivo [44, 45]. El análisis de las muestras de aliento como una matriz compleja completa con miles de compuestos puede ofrecer un perfil general o un patrón para distinguir e identificar una enfermedad.

---

## 1.5 CONCLUSIONES

Las enfermedades no transmisibles son la principal causa de muerte a nivel mundial. Entre ellas se destaca el cáncer gástrico, siendo una enfermedad con gran incidencia en Colombia y catalogándose como la principal causa de muertes por cáncer en hombres, y la cuarta en mujeres. Esto se debe principalmente a que la mayoría de los pacientes no presentan síntomas específicos en la fase temprana de la enfermedad, lo que dificulta su detección. Además, las pruebas diagnósticas actuales se basan en los

resultados de la endoscopia y biopsia, que son invasivos, incómodos para el paciente, costosos y no fácilmente disponibles en países en vía de desarrollo como es el caso de Colombia. Todo esto contribuye a que gran porcentaje de los pacientes sean diagnosticados con la enfermedad después de los 50 años, aunque hayan podido desarrollarla mucho antes. Ante este panorama, surge la necesidad de un método alternativo que coadyuve al diagnóstico precoz, contribuyendo a la aplicación de tratamientos más eficaces y prolongando la esperanza y calidad de vida de los enfermos. En este sentido, el análisis del aliento exhalado puede ser muy prometedor, ya que refleja los cambios metabólicos que se producen en el organismo desde la fase incipiente de la enfermedad. En el aliento exhalado se encuentran más de mil compuestos orgánicos volátiles, que pueden tener orígenes endógenos o exógenos. Los COV endógenos son importantes para determinar las fuentes y los posibles efectos negativos asociados con la presencia de la enfermedad en el organismo, y a determinar la gravedad del desarrollo de la enfermedad o el progreso de la enfermedad a lo largo del tiempo. Las clases de COV endógenos más comunes en la respiración son los hidrocarburos saturados e insaturados, y compuestos que contienen oxígeno, azufre y nitrógeno. Los COV exógenos en cambio, que se absorben por inhalación, absorción por la piel y por ingestión, no necesariamente indican la presencia de la enfermedad, sino proporcionan pistas de que la enfermedad es más probable y puede estar presente. Los biomarcadores del aire exhalado, que son compuestos exhalados en concentraciones significativamente diferentes entre los sujetos libres de la enfermedad y los que la tienen, pueden utilizarse como indicadores de la posible presencia de la enfermedad. No obstante, un solo biomarcador no es suficiente para establecer un diagnóstico definitivo, y las muestras de aliento deben analizarse como una matriz compleja completa con miles de compuestos para identificar un patrón distintivo de enfermedad. A partir de estas consideraciones, en este estudio doctoral se evalúa el análisis del aire exhalado como un método alternativo para identificar de manera más rápida y en fase más temprana el cáncer gástrico.



## CAPÍTULO 2

---

### ANÁLISIS DEL ALIENTO EXHALADO



---

## 2.1 MUESTREO DEL ALIENTO EXHALADO

La recolección de las muestras representa una de las etapas cruciales en el análisis del aliento [21], ya que diferentes fenómenos como la contaminación de la muestra, pérdida de analitos durante el muestreo e interacciones de la muestra con el propio dispositivo de muestreo pueden modificar la composición de la misma y, por tanto, producir una distorsión de los resultados del análisis [46].

Para el análisis de muestras de aliento hay dos métodos de muestreo, “*on-line*” y “*off-line*” [47]. Las muestras pueden recolectarse y analizarse directamente después de la recolección (“*on-line*”), o almacenarse en un contenedor antes de ser entregadas a los instrumentos de medición (“*off-line*”). La medición *on-line* permite un análisis rápido de la muestra una vez recolectada; para la medición *off-line*, la muestra es capturada, almacenada y medida en otro momento.

También es importante tener en cuenta que las muestras de aliento se pueden dividir en los primeros aproximadamente 1500 ml de aire de las vías respiratorias superiores y los siguientes aproximadamente 350 ml de aire alveolar contenido en regiones de pulmón más profundas.

---

### 2.1.1 DISPOSITIVOS DE MUESTREO

En la literatura se encuentran diferentes dispositivos que han sido desarrollados con el propósito de realizar un muestreo adecuado. Algunos de ellos han sido comercializados y otros han sido elaborados en el marco de trabajos de investigación. Los métodos de muestreo y recolección de aliento aún no se han estandarizado, lo que

contribuye a la variabilidad de los resultados analíticos entre los diferentes trabajos de investigación [48, 49].


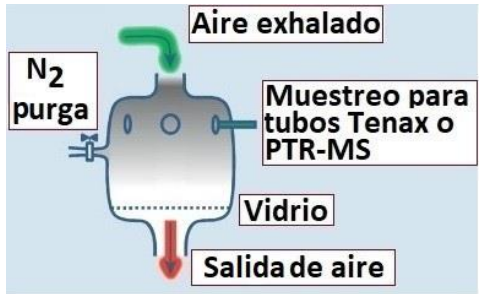
En la tabla 2.1 se presentan algunas de las tecnologías de captura de COV del aliento, las cuales presentan ciertas ventajas y desventajas a tener en cuenta a la hora de seleccionar la más adecuada en función del estudio a realizar. Además, se pueden usar boquillas desechables y filtros bacterianos para prevenir la contaminación de paciente a paciente, y se pueden emplear espirómetros en línea en los dispositivos de muestreo para controlar el volumen de la respiración [50].

Entre los dispositivos de muestreo mencionados en la tabla 2.1, el *Bio-VOC*<sup>TM</sup>, comercializado por la empresa Markes Internacional de Reino Unido, presenta las características necesarias para el propósito del estudio que se pretende realizar en esta tesis doctoral, teniendo en cuenta la debilidad física de los pacientes con enfermedades gástricas.



El dispositivo Bio-VOC consta de un recipiente cilíndrico de polietileno, con un volumen interno de 129 ml, provisto de una abertura en un extremo donde se acopla una boquilla desechable, que posteriormente se cambia por un émbolo el cual sirve como mecanismo de traspaso del aliento a un sistema analizador o un dispositivo de almacenamiento, y de otra pequeña abertura en el otro extremo, por donde sale el aire, sin retorno (ver la figura del Bio-VOC presentada en la tabla 2.1).

Durante el muestreo de la respiración, el paciente exhala normalmente en el dispositivo Bio-VOC a través de una boquilla desechable hasta vaciar totalmente los pulmones, sin necesidad de realizar un lavado pulmonar extenuante y proporcionar una exhalación profunda, que puede agotar a los pacientes con afecciones gástricas. La primera parte de la respiración, que contiene los compuestos exógenos inhalados por el paciente, sale a través del extremo abierto sin retorno del dispositivo de muestreo, y el

Tabla 2.1. Dispositivos de muestreo actuales para la recolección de aliento, ventajas y desventajas. Adaptado de [51].

Dispositivo de muestreo	Ventajas	Desventajas	Tecnología compatible	Referencias
<p><b>Bolsas de muestreo Tedlar (PVF) / Mylar / poliéster y aluminio (PEA)</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bajo coste.</li> <li>▪ Químicamente estables</li> <li>▪ Se puede conectar a equipos de respiración clínica estándar.</li> <li>▪ Reutilizables.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Susceptible a fugas y frágil.</li> <li>▪ Puede sufrir degradación ultravioleta, lo que resulta en niveles inflados de hidrocarburos.</li> <li>▪ El agua puede condensarse dentro de la bolsa e interferir en el análisis.</li> <li>▪ Se debe tener cuidado con la limpieza y el almacenamiento para evitar la contaminación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Puede utilizarse microextracción en fase sólida (SPME) para capturar los COV para análisis por cromatografía de gases, o puede conectarse directamente a analizadores "on-line", como sistemas de olfato electrónico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ [52, 53]</li> </ul>
<p><b>Reactor de flujo</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Buena reproducibilidad de la muestra debido a volúmenes de muestra precisos que se examinan cada vez.</li> <li>▪ Inerte</li> <li>▪ El flujo constante minimiza el riesgo de condensación del agua.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alto coste.</li> <li>▪ Requiere un flujo constante de gas inerte.</li> <li>▪ Difícil manejo.</li> <li>▪ El almacenamiento de varias muestras no es práctico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Se pueden conectar tubos de desorción térmica al puerto de muestreo o pueden conectarse a sistemas de espectrometría de masas por reacción de transferencia de protones (PTR-MS) o a un analizador similar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ [54, 55]</li> </ul>

Capítulo 2 | Análisis del aliento exhalado

<p><b>Aparato de recolección de aliento BCA</b></p>  <p>The image shows a long, horizontal metal tube mounted on a black tripod stand. To the right of the stand is a blue and white electronic control unit with a digital display and several knobs.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Muestra preferentemente el aliento final.</li> <li>▪ Además tiene dos trampas separadas que también pueden captar el aliento inicial.</li> <li>▪ Fácil de usar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Gastos potencialmente elevados.</li> <li>▪ De gran tamaño.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Compatible con varios tipos de sistemas de cromatografía de gases.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ [56]</li> </ul>
<p><b>Muestreador de aliento Bio-VOC</b></p>  <p>The image shows a clear plastic cylindrical container with a green lid and a green tube extending from the bottom. A small white cap is also visible next to the tube.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Económico.</li> <li>▪ Inerte.</li> <li>▪ Evita la contaminación respiratoria.</li> <li>▪ Fácil manejo.</li> <li>▪ Portable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Solo puede atrapar 129 ml de aliento final y no puede preconcentrar.</li> <li>▪ La proporción de aliento muestreado variará según el volumen pulmonar de los sujetos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Puede transferirse el aliento en tubos preconcentradores estándar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ [57, 58]</li> </ul>

Bio-VOC sólo retiene la última parte de la respiración (129 ml de volumen), que corresponde al aire alveolar; éste contiene los compuestos llevados por la sangre a los pulmones, y es él más propicio a contener los metabolitos característicos de las lesiones gástricas [59].

Para la limpieza del dispositivo, éste se desensambla en sus partes constituyentes, las cuales se introducen en una solución de desinfectante disuelto en agua destilada, y posteriormente se secan naturalmente sin limpiar. La limpieza del Bio-VOC es mucho más fácil de realizar comparada, por ejemplo, con la limpieza de las bolsas de muestreo (el otro dispositivo de muestreo de coste relativamente bajo), en cuyo caso es necesario usar nitrógeno puro. Otro aspecto destacable es la robustez del Bio-VOC y su fácil manejo, pudiéndose utilizar sin la participación de personal médico calificado.

---

### **2.1.2 ALMACENAMIENTO DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EXHALADOS**

Para la medición “off-line”, una vez retenidos en el dispositivo de muestreo, los compuestos volátiles exhalados por los pacientes se traspasan a contenedores de almacenamiento que poseen un material adsorbente preconcentrador con el objetivo de almacenarse (normalmente en un refrigerador a una temperatura de 4°C o en un congelador a una temperatura de -20°C), y posteriormente liberarse por desorción térmica para ser analizados.

La selección del adsorbente está basada en las características del analito o analitos de interés, así como también en las condiciones de adsorción y desorción de los materiales adsorbentes. En la tabla 2.2 se lista algunos de los adsorbentes más empleados [60]. Todos difieren en el número y tipo de sustancias que adsorben, así como en la cantidad de analitos que retienen.

Tabla 2.2. Materiales adsorbentes y sus propiedades físicas. Adaptado de [60].

Nombre adsorbente	Clase adsorbente	Malla (granulometría)	Peso adsorbente (mg)	Densidad adsorbente (g/cm <sup>3</sup> )	Temperatura de desorción (°C)	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)
Carbosieve S-III	Tamices moleculares de carbono	60/80	379	0,76	330°	820
Carboxen-563	Tamices moleculares de carbono	20/45	275	0.55	330°	510
Carboxen-564	Tamices moleculares de carbono	20/45	297	0.59	330°	400
Carboxen-569	Tamices moleculares de carbono	20/45	308	0.61	330°	485
Carboxen-1000	Tamices moleculares de carbono	60/80	258	0.52	330°	1200
Carboxen 1001	Tamices moleculares de carbono	60/80	291	0.58	330°	500
Carboxen-1002	Tamices moleculares de carbono	40/60	227	0.46	330°	1100
Carboxen-1016	Tamices moleculares de carbono	60/80	239	0.48	330°	75
Carboxen-1018	Tamices moleculares de carbono	60/80	402	0.80	330°	700
Carbopack F	Carbón grafitado	60/80	399	0,81	330°	5

Capítulo 2 | Análisis del aliento exhalado

Carbopack C	Carbón grafitado	60/80	416	0.85	330°	10
Carbopack Y	Carbón grafitado	60/80	254	0.51	330°	24
Carbopack B	Carbón grafitado	60/80	217	0.43	330°	100
Carbopack X	Carbón grafitado	60/80	290	0.58	330°	240
Tenax TA	Polímero poroso	60/80	143	0.28	300°	35
Tenax GR	Polímero poroso	60/80	204	0.41	300°	24
Porapak N	Polímero poroso	50/80	188	0.37	180°	250-350
Chromosorb 106	Polímero poroso	60/80	151	0.30	180°	750
Hayesep D	Polímero poroso	60/80	171	0.35	180°	795
Perlas de vidrio	Otro	60/80	826	1.68	330°	<5
Gel de sílice de grado 15	Otro	40/60	380	0,76	180°	750
Carbón de coco	Otro	20/40	283	0.57	180°	1070
Carbón de petróleo	Otro	20/40	250	0.50	180°	1050

Los adsorbentes son ubicados en tubos de vidrio, de acero inoxidable o de polietileno, de pequeño tamaño y muy fácil manipulación. Por lo general, estos dispositivos tienen en su interior varias capas de material adsorbente de diferente tamaño de grano y separadas por espuma plástica o fibra de vidrio [61]. Los analitos migran a través del lecho adsorbente donde algunos de ellos penetran mientras que otros son retenidos por el adsorbente, lo que permite la separación selectiva de los gases y en algunos casos impide la formación de sustratos contaminantes (figura 2.1).

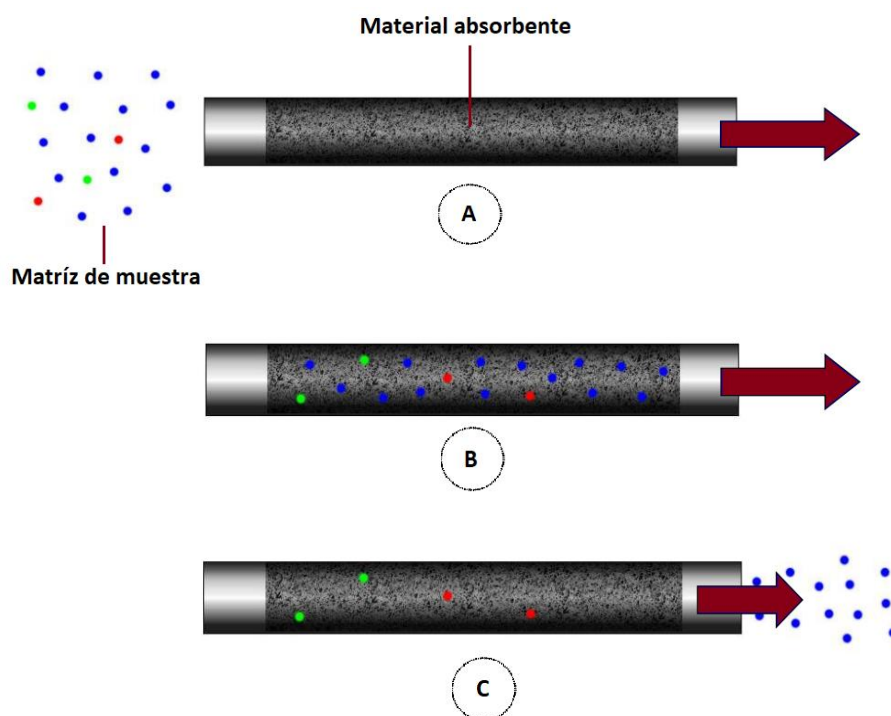


Figura 2.1 Funcionamiento del tubo adsorbente. (A) Tubo adsorbente (B) La muestra pasa a través del adsorbente (C) Los compuestos de interés quedan retenidos. Reproducido de [62].

Un material adsorbente muy adecuado para el almacenamiento de las muestras de aliento es el Tenax TA (ORBO™ 420, Sigma-Aldrich); su carácter hidrofóbico hace además que no retenga la humedad presente en el aliento, siendo por lo tanto muy apropiado para el almacenamiento de COV de aliento [63]. El tubo de almacenamiento con material adsorbente Tenax TA, así como los diferentes elementos que lo componen, es ilustrado en la figura 2.2.

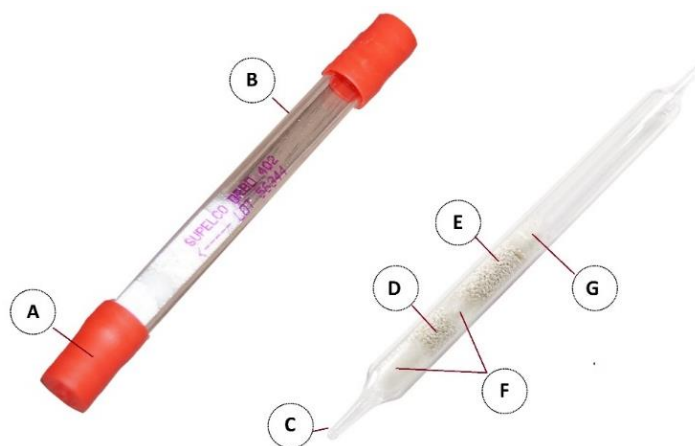


Figura 2.2 Tubo adsorbente ORBO 402 Tenax® TA. (A) Tapones de sellado, que se usan para prevenir la contaminación (B) Tubo de vidrio (C) Puntas selladas, que se cortan antes de transferir la muestra (D) Capa adsorbente (Tenax TA) de respaldo (E) Capa adsorbente (Tenax TA) principal (F) Espuma separadora (G) Lana de vidrio de alta pureza.

## 2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ANÁLISIS

Actualmente hay una gran variedad de plataformas analíticas para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles. Sin embargo, el análisis de la respiración exhalada sigue siendo muy difícil de realizar debido a que la mayoría de los COV que son clínicamente relevantes, están presentes en concentraciones muy bajas y la humedad relativa de la respiración exhalada es muy alta (generalmente alrededor del 80%). Para detectar y cuantificar los compuestos presentes en el aliento existen dos métodos analíticos: métodos *ópticos* y *no ópticos* [64].

Los métodos *ópticos* se basan especialmente en las técnicas láser, como la espectroscopia de absorción láser de diodo sintonizable, espectroscopia de reducción de cavidad, espectroscopia de salida de cavidad integrada, espectroscopia de absorción mejorada por cavidades, y espectroscopia foto-acústica.

No obstante, las técnicas *no ópticas* han ganado gran popularidad y han tenido un aporte valioso en la detección y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles presentes en el aliento, ya que son capaces de detectar en su mayoría COV con la sensibilidad y el rango dinámico necesarios para el análisis de la respiración. Se destacan así la espectrometría de masas por reacción de transferencia de protones (PTR-MS), la espectrometría de masas con tubo de flujos de iones (SIFT-MS), y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la espectrometría de masas (MS) siendo una herramienta analítica muy útil para la investigación de la respiración que proporciona información esencial sobre los compuestos que forman la muestra.

La cromatografía de gases (GC) es un proceso físico en el que los componentes de una mezcla se separan por la distribución diferente entre una fase móvil y una fase estacionaria. Durante el proceso cromatográfico de separación, la fase móvil transporta el espécimen a lo largo de la columna cromatografía que contiene la fase estacionaria. A medida que la fase móvil fluye por la estacionaria, los solutos se distribuyen entre ambas fases. Los que son más afines a la fase estacionaria viajan más lento que los que no lo son. La técnica de GC permite separar la matriz multicomponente de la respiración exhalada en compuestos constituyentes individuales y proporciona información sobre la composición molecular y la identidad molecular de los compuestos. Para su análisis, la muestra se inyecta en un gas portador inerte (generalmente helio), que la transporta a la columna cromatográfica, que termina separando todos los componentes (figura 2.3).

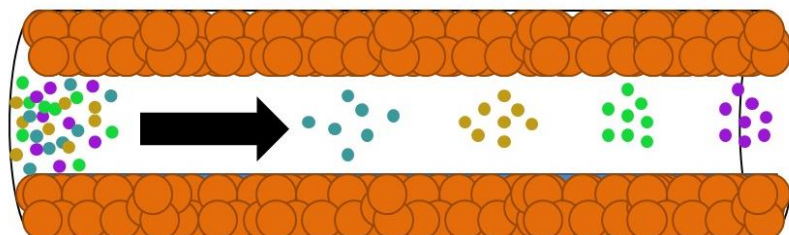


Figura 2.3 Separación de componentes en cromatografía de gases. Reproducido de [65].

La separación de compuestos se produce debido a sus diferentes tasas de partición al entrar en contacto con la fase estacionaria de la columna. De acuerdo con la afinidad y la interacción relativa de los diferentes compuestos con la fase estacionaria, cada compuesto se eluye en un momento diferente, es decir, cada compuesto tiene un tiempo de retención específico y llega al detector en un momento diferente. El tiempo de retención de cada compuesto depende de diferentes parámetros como la temperatura, la composición molecular y la longitud de la columna. La columna es típicamente enrollada, delgada (usualmente tiene un diámetro interno de 0.25 mm) y muy larga (varios metros de longitud), y se coloca en un horno de temperatura controlada relativamente pequeño [66]. En la figura 2.4 se muestra un esquema simplificado de las partes de un cromatógrafo de gases.

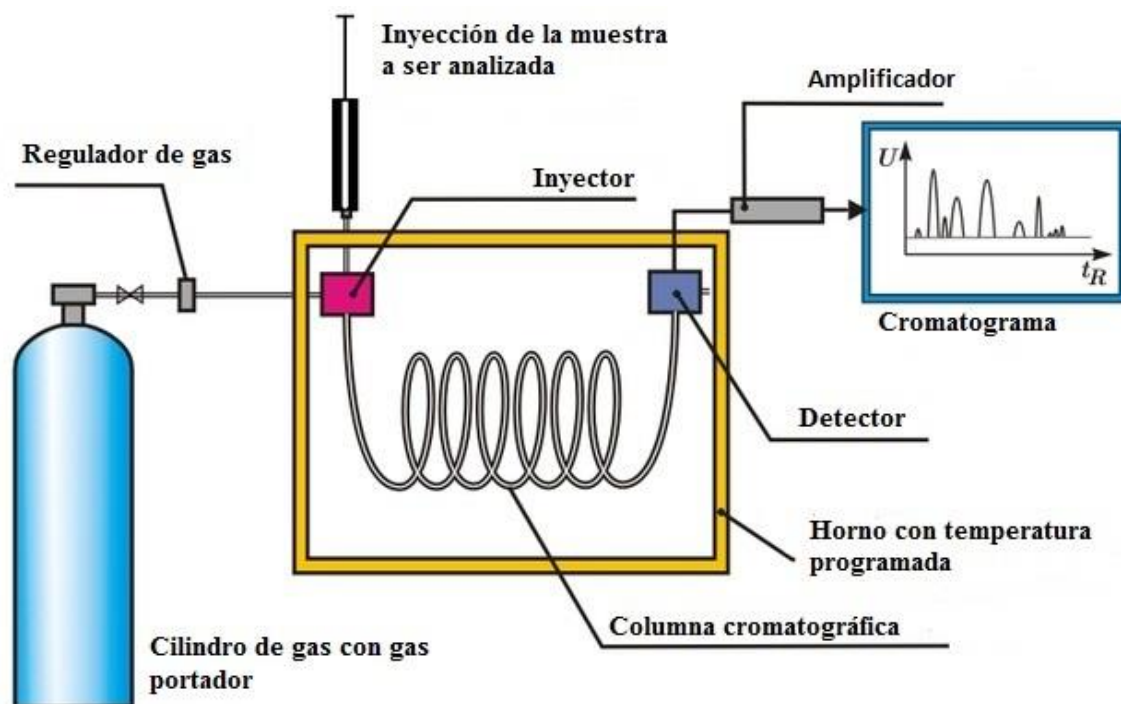


Figura 2.4 Parte de un cromatógrafo de gases. Reproducido de [67].

En el inyector se coloca una microjeringa de donde se libera de manera inmediata un volumen de muestra en el orden de los  $\mu\text{L}$ , que es llevada por el gas portador hacia la columna cromatográfica. Tras recorrer la muestra toda la longitud de la columna y hacerse la separación de los compuestos en función de su afinidad con la columna cromatográfica, éstos llegan al detector, cuyas señales se amplifican obteniendo así los cromatogramas.

En la década de los 90, el avance de las técnicas analíticas ha incluido la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas como una de las técnicas de referencia para el análisis cualitativo y cuantitativo de componentes en el aliento exhalado. Pauling et al. fue pionero en el análisis exhaustivo de la respiración mediante cromatografía de gases [14]. Desde entonces, la GC se ha convertido en una de las técnicas analíticas más utilizadas para detectar y cuantificar compuestos en el aliento exhalado [68, 69].

---

### 2.3 SISTEMAS DE OLFATO ELECTRÓNICO

El sistema olfativo humano es muy complejo y ha sido investigado asiduamente. En 2004 se le otorgó el premio nobel en fisiología o medicina a Richard Axel y Linda B. Buck por su trabajo sobre los receptores olfatorios y la organización del sistema olfatorio [70]. El sentido del olfato inicia su funcionamiento cuando es estimulado por las moléculas que hay en el aire que respiramos o por sustancias volátiles que contienen los alimentos que se llevan a la boca. Éste empieza con la nariz e incluye otras partes de la cabeza y el cerebro. En el proceso del olfato se ven implicadas las fosas nasales, las neuronas receptoras del olfato, el bulbo olfativo y el cerebro, que es donde se realiza el proceso de identificación de un aroma.

A pesar de que los seres humanos son capaces de percibir, identificar y clasificar una gran variedad de olores, tienen una sensibilidad limitada (en comparación con algunos

animales por ejemplo). Para solventar este inconveniente, se han desarrollado sistemas artificiales de olfato llamados sistemas de olfato electrónico o nariz electrónica (NE). Estos sistemas pueden considerarse una copia muy simplificada del órgano olfativo humano, donde *células receptoras* son reemplazadas por *sensores de gases* no específicos que reaccionan con diversos compuestos volátiles; no hay mucus en el que las moléculas olorosas puedan disolverse, pero éstas son adsorbidas por el material sensible de los sensores; la *transducción* de la señal por los *receptores olfativos* es reemplazada por *circuitos de acondicionamiento* de la señal, convirtiéndola normalmente en una señal eléctrica; y por último la *codificación de la señal neuronal* para poder reconocer un olor y su intensidad en los humanos es sustituida en la NE por un algoritmo de *reconocimiento de patrones* [71]. La correlación entre el sistema del olfato humano y el olfato electrónico se presenta en la figura 2.5.

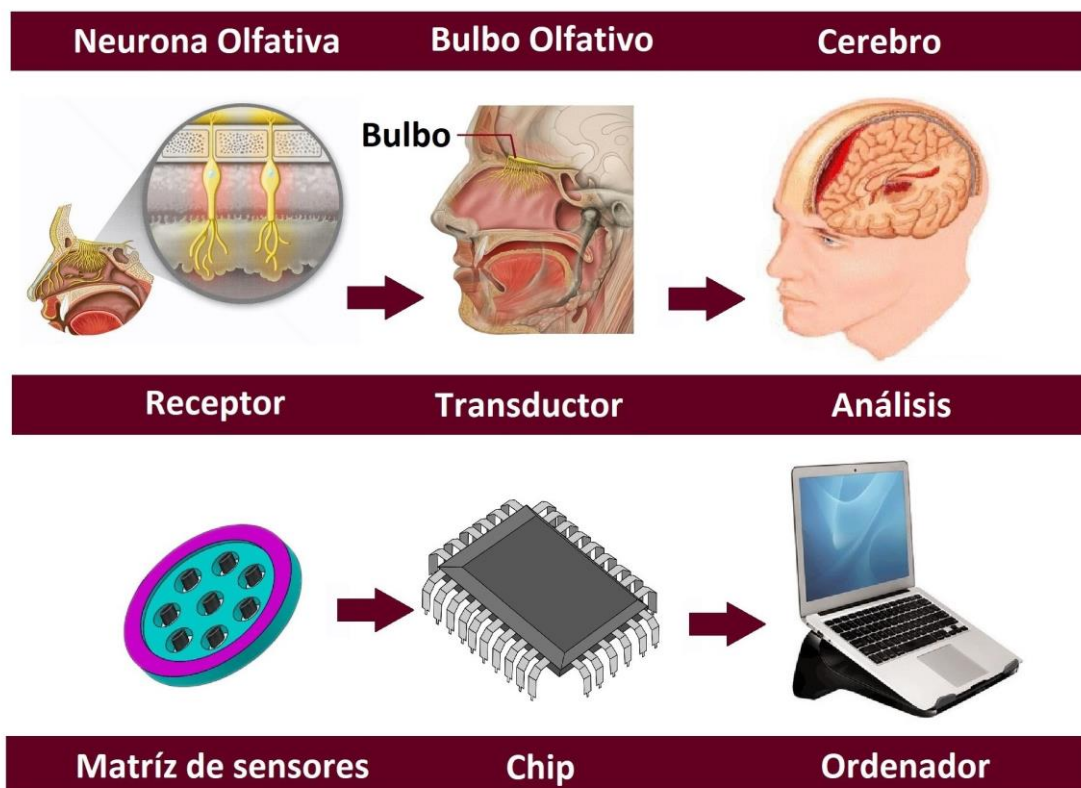


Figura 2.5 Elementos básicos de una NE versus sistema olfativo humano. Adaptado de [72].

Gardner y Bartlett (1993) definieron la NE como: “un instrumento compuesto por un conjunto de sensores químicos electrónicos con especificidad parcial y un apropiado sistema de reconocimiento de patrones, capaz de reconocer olores simples o complejos” [73].

La primera nariz electrónica fue desarrollada en 1964 por Wilkens y Hatman usando reacciones redox de odorantes en un electrodo. En 1965, este diseño fue seguido rápidamente por otros diseños que se basaron en que un único odorante puede activar diferentes receptores olfativos, es decir, que los odorantes son reconocidos por diferentes combinaciones de receptores olfativos [74-76]. En 1982, Persaud y Dodd desarrollaron una nariz electrónica con transductores semiconductores que era capaz de discriminar entre diferentes odorantes [77], y en 1985 Ikegami y Kaneyasu idearon una nariz electrónica basada en un óxido semiconductor que producía diferentes patrones en respuesta a los olores [78].

El desarrollo de narices electrónicas fue enfocado en un comienzo para reemplazar a los paneles de cata en la clasificación de aromas, debido a que éstos se consideran costosos y algunas veces subjetivos, y sus valoraciones se pueden ver afectadas por el cansancio, estado anímico, el clima y otros factores externos. En la actualidad, las narices electrónicas no son solamente usadas para clasificaciones de aromas, sino también para la detección de olores. De ahí que su importancia y utilización se haya extendido a aplicaciones en la agroindustria, medio ambiente, la seguridad, y la *medicina* [79].

En el campo de la medicina, la nariz electrónica se convierte en una herramienta útil para la detección de compuestos orgánicos volátiles presentes en la respiración humana [80]. Al estar compuesta por un dispositivo formado por varios sensores químicos donde cada sensor tiene un material de detección diferente, al exponerse a las partículas volátiles presentes en el aliento, los sensores experimentan cambios específicos

traducidos en un patrón o perfil de COV mediante el procesamiento de las señales obtenidas [81]. Estos patrones de COV correctamente analizados pueden usarse como indicadores de varios procesos bioquímicos que se producen tanto de forma fisiológica como en distintas enfermedades, lo que conlleva a su aplicabilidad potencial en el campo de la medicina, en particular, para la detección de las enfermedades a través del aliento exhalado. Una de las principales ventajas de usar NE para el diagnóstico de enfermedades es que proporcionan resultados rápidos, causando menos estrés o ansiedad a los pacientes que los métodos de diagnóstico tradicionales.

---

### 2.3.1 SENSORES QUÍMICOS DE GASES

Los sensores químicos de gases, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), se clasifican, de acuerdo al mecanismo de transducción, en: dispositivos ópticos, electroquímicos, eléctricos, de masa, magnéticos, termométricos y radiométricos. Según Fraden [82], todos los procesos de detección química pueden ser clasificados por los fenómenos reales del indicador utilizado para la detección, y según la estrategia de medición utilizada. En este sentido, los sensores se clasifican en dos grandes grupos:

- *Sensores químicos directos*, que son los que utilizan una reacción química que afecta directamente una característica eléctrica tales como la resistencia, el voltaje, la corriente o la capacitancia. Estos dispositivos requieren el acondicionamiento de la señal, pero no necesitan un transductor.
- *Sensores químicos indirectos o complejos*, que son los que requieren alguna forma de transducción para obtener la señal eléctrica. Los fenómenos indirectos incluyen cambios de frecuencia, de la modulación de la luz, de temperatura o de masa.

La tabla 2.3 muestra los diferentes sensores químicos utilizados en las narices electrónicas y las características medidas por estos sensores.

Tabla 2.3. Clasificación de los sensores químicos de gases utilizados en narices electrónicas

Directos	Principio	Parámetro medido	Tipo de Sensor
	Electroquímico	Corriente	Amperimétrico
Eléctrico	Resistencia, Conductancia, Impedancia	Conductivo	
	Característica corriente-voltaje (I-V)	Transistor de efecto de campo	
Indirectos	Principio	Parámetro medido	Tipo de Sensor
	De masa	Frecuencia	Piezoeléctrico: Microbalanza de cristal de cuarzo; Ondas acústicas superficiales
	Óptico	Intensidad de luz, Longitud de onda	Sensor de fibra óptica

La detección de compuestos con estos dispositivos se realiza analizando el cambio en una o más de las propiedades de los sensores cuando se exponen a la muestra. Aunque no son selectivos para un cierto compuesto, dependiendo del material de detección empleado, son propensos a reaccionar preferiblemente con ciertos grupos de compuestos químicos.

En la figura 2.6 se presenta la estructura de un sensor químico resistivo, el cual se basa principalmente en un par de electrodos interdigitados y un material sensible encima de éstos. Si el sensor se expone a un analito, la resistencia cambia debido a la interacción entre el material sensible de detección y el analito. Los procesos de adsorción/desorción química y/o física del analito por el material de detección generalmente son reversibles, lo que lleva a la recuperación de las condiciones iniciales de las características del sensor después de la evacuación del analito.

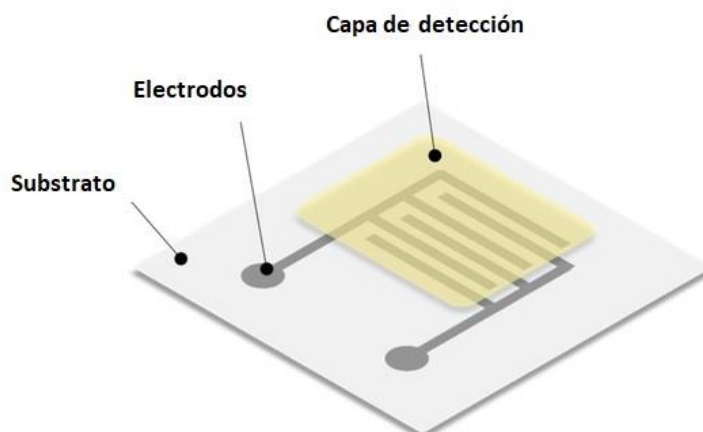


Figura 2.6 Estructura de un sensor químico-resistivo. Adaptado de [83].

En aplicaciones de diagnóstico de enfermedades clínicas se ha utilizado una amplia gama de sensores químicos de gases basados en diferentes tecnologías de operación [84]. Los tipos más comunes incluyen ondas acústicas superficiales, microbalanzas de cristal de cuarzo, y sensores químicos resistivos con diferentes materiales de detección, tales como óxidos metálicos, nanotubos de carbono, polímeros conductivos y nanopartículas de metal funcionalizadas con materiales orgánicos.

En la medición de los compuestos exhalados es necesario mencionar el avance en la fabricación de los sensores químicos de gases, los cuales son los elementos principales en la detección y análisis de las muestras de aliento. En la actualidad los sensores presentan varias ventajas, tales como tamaño pequeño, operación simple y bajo coste. Debido al rápido progreso en micro y nanotecnología, los sensores químicos de gases se están desarrollando cada vez con más sensibilidad, menos consumo de energía, menor tiempo de respuesta y menor tamaño. Por lo tanto, pueden ser miniaturizados fácilmente y son adecuados para desarrollar dispositivos portátiles de análisis de aliento.

---

### 2.3.2 ANÁLISIS DE SEÑALES Y RECONOCIMIENTO DE PATRONES

El análisis de señales agrupa una variedad de teorías matemáticas y algoritmos que permiten realizar una secuencia de operaciones orientadas a la extracción de características de las señales de las respuestas obtenidas por los sensores, que son utilizadas para construir modelos para predicción, identificación o clasificación de analitos o muestras.

El paso previo a la aplicación de técnicas de reconocimiento de patrones es lo que se denomina *preprocesado*. Su importancia radica en la influencia significativa que aporta al funcionamiento de los módulos subsecuentes [85]. Aunque la señal preprocesada depende de la tecnología de los instrumentos de medición, se identifican dos etapas generales para su análisis: *normalización de datos* y *reducción de la dimensionalidad*.

La *normalización* es una técnica para escalar conjuntos de datos para ser comparados adecuadamente. Para mencionar el funcionamiento de ellos cabe referir la matriz de datos como una matriz de  $m$  filas por  $n$  columnas, donde cada una de las  $m$  filas describe una medida a través de  $n$  variables extraídas de las señales de los sensores (una variable por columna).

- **Centrado de datos (“mean-centring”)**: En esta normalización, a cada una de las columnas se le resta el valor medio. Por consiguiente, la media de cada variable será nula. Esta normalización es útil para los métodos lineales de reconocimiento de patrones como por ejemplo el análisis de componentes principales (PCA).

- **Auto-escalado (“autoscaling”)**: En este método, se les resta el valor medio a todos los datos de una columna, y el resultado se divide por la desviación estándar de dicha columna. De esa forma, todas las variables tendrán la media igual a cero y la

varianza igual a la unidad. Con esta normalización se consigue que los datos de todas las variables estén dentro del mismo rango, y es muy útil cuando las variables que describen cada medida tienen valores muy diferentes, como es el caso de las NE formadas por una matriz de sensores de diferentes valores de resistencia. De este modo, se da la misma significancia a las respuestas de todos los sensores, independientemente de los valores de sus resistencias.

- **Normalización por columna:** Se dividen los valores de cada columna por el valor máximo de dicha columna, por lo cual cada columna tendrá valores entre “0” y “1”.
- **Normalización por matriz:** Se divide toda la matriz por el elemento máximo de la misma, y solo un elemento tendrá el valor de la unidad. Es muy usado para redes neuronales como la Fuzzy ARTMAP.
- **Normalización por escala decimal:** En esta normalización se mueven los puntos decimales de todos los datos de la matriz con el mismo factor de división o multiplicación.
- **Normalización “min-max”:** En esta normalización, todos los datos de la matriz son ubicados dentro de un nuevo intervalo de valores.

La *reducción de la dimensionalidad* constituye otra etapa importante que se puede aplicar en el pre-procesamiento de señales. Su objetivo es lograr una menor dimensión del número de variables que contengan la mayor información, reduciendo la complejidad del análisis de los datos y mejorando el rendimiento computacional, lo que se convierte en un ahorro en coste y tiempo. El PCA es uno de los métodos más aplicados en esta fase.

Una vez finalizada la etapa de pre-procesamiento, se da inicio al *procesamiento* de los datos (también llamada la fase de *reconocimiento de patrones*). Ésta se encarga de

realizar los procesos de entrenamiento y construcción del modelo de clasificación, ya sea de forma no supervisada o supervisada, y de estimación o predicción de nuevas medidas. La tarea fundamental es determinar el proceso de decisión para separar los grupos o clases analizados. Existe una gran variedad de técnicas para efectuar este paso, que se dividen en algoritmos *no supervisados*, siendo PCA el más utilizado, y *supervisados*, entre los que destacan las redes neuronales artificiales (RNA) y las máquinas de soporte vectorial (SVM) [76, 86].

El *análisis de componentes principales*, es una técnica que puede ser utilizada para realizar un análisis visual o para procesos más complejos de clasificación de datos. El propósito de esta técnica es la extracción de las características de los datos contenidos en el conjunto inicial de datos, en un número pequeño de nuevas variables (generalmente dos o tres), llamadas *componentes principales*, que se calculan como una combinación lineal de las variables iniciales. El *primer componente principal* del PCA capturará la mayor varianza de todos los datos, el *segundo componente principal* capturará la mayor varianza de los datos restantes, bajo la restricción de ser ortogonal al primer componente principal, y así sucesivamente. De esta manera se logra conseguir proyectar la información contenida por el conjunto inicial de datos en un espacio de pocas dimensiones que se puede representar gráficamente.

Una *red neuronal artificial*, está formada por un conjunto de neuronas artificiales interconectadas entre sí para transmitir señales. Existen capas de entrada (por donde se ingresan los datos), capas de salida (por donde se obtienen los resultados) y una o varias capas ocultas (por donde pasan y se procesan los datos) [87], es decir, su arquitectura se basa en la organización y disposición de las neuronas del cerebro humano. Los parámetros fundamentales de la red son: el número de capas, el número de neuronas por capa, el grado de conectividad y el tipo de conexiones entre neuronas. Existen varias arquitecturas de redes, con aprendizaje supervisado o no supervisado, entre ellas la red perceptron simple, la red de Hopfield, la red perceptron multicapa, la red neuronal

competitiva simple, las redes neuronales online ART1, las redes neuronales competitivas ART2, y las redes neuronales auto organizadas (mapas de Kohonen).

Las *máquinas de soporte vectorial*, son una técnica fundamental para procesar gran cantidad de información por medio de algoritmos de aprendizaje, cuyo objetivo principal radica en encontrar la clasificación óptima entre dos clases a través de los vectores de soporte los cuales definen el borde de separación entre éstas. En general, las SVM usan algoritmos lineales de separación, en donde se busca que la distancia entre los puntos más cercanos a la línea de separación entre las clases sea máxima. También se pueden utilizar funciones de tipo Kernel, que determinan curvas no lineales de separación entre las clases.

Una de las principales cuestiones a tener en cuenta en los métodos supervisados es el *overfitting* (sobreajuste o sobre-entrenamiento), ya que durante la fase de entrenamiento el algoritmo intenta hacer correlacionar todos los datos de entrada con las salidas deseadas, ocasionando que el modelo sólo se ajuste a aprender estos casos particulares en detrimento de la generalización, y puede ser insuficiente para el reconocimiento correcto de nuevos datos de entrada. Ante esta dificultad, cuando se cuenta con un número limitado de datos (medidas) para entrenar el modelo, se suelen aplicar métodos de validación cruzada como el *leave-one-out* (o dejar uno fuera) o *bootstrapping*.

En el *leave-one-out*, una medida es dejada fuera durante la fase de entrenamiento y el modelo es entrenado con las demás medidas restantes, mientras la medida dejada fuera es clasificada por el modelo como una medida completamente nueva o desconocida; este proceso se repite un número de veces igual al número total de medidas, dejando cada vez fuera otra medida durante la fase de entrenamiento, y se calcula la tasa de acierto como el porcentaje de medidas clasificadas correctamente.

En el *bootstrapping*, se subdivide aleatoriamente el conjunto de datos de entrada en dos: uno para entrenamiento y otro para validación, que el modelo no conocerá de antemano. Esta división suele hacerse en 70% de los datos para entrenar y 30% de los datos para validar, y suele repetirse un número elevado de veces (entre 10.000 y 100.000) para obtener resultados fiables. El conjunto de validación debe tener muestras diversas en lo posible y una cantidad de muestras suficiente para poder comprobar los resultados una vez entrenado el modelo.

---

## 2.4 CONCLUSIONES

Para el análisis del aliento, la recolección de las muestras representa una de las etapas fundamentales, teniendo en cuenta que se debe evitar la contaminación de la muestra y pérdida de analitos. A lo largo de los últimos años se han desarrollado diversos dispositivos de muestreo que permiten la recolección del aire exhalado, que han evolucionado desde simples bolsas y tubos, hasta dispositivos de una mayor complejidad. Entre ellos, el Bio-VOC presenta una serie de características deseables tales como bajo coste, robustez, fácil manejo, exhalación normal del paciente durante la recogida de la muestra, además de permitir la recolección del aire alveolar que es el más propicio a contener los metabolitos característicos de las lesiones gástricas. La muestra de aliento puede ser analizada directamente después de su recolección, o se puede almacenar en contenedores provistos de un material adsorbente idóneo para retener y posteriormente liberar por desorción térmica los analitos a investigar. Entre estos dispositivos, se destaca el tubo de almacenamiento con material adsorbente Tenax TA, el cual además es hidrofóbico y no retiene la humedad presente en el aliento exhalado. El análisis de las muestras empleando técnicas analíticas de cromatografía de gases permite la identificación de los distintos componentes de la muestra, así como el análisis cuantitativo de los compuestos identificados, y en última instancia la identificación de los biomarcadores de la enfermedad. Por otro lado, los sistemas de olfato electrónico

dotados de sensores químicos de gases junto a algoritmos de reconocimiento de patrones, permiten identificar un patrón o perfil de COV específico de la enfermedad, sin necesidad de identificar cada compuesto en sí, y representan una técnica complementaria de análisis de la muestra, más económica y más rápida que las técnicas analíticas. Los sensores más comúnmente utilizados en aplicaciones de diagnóstico de enfermedades a través del aliento son de tipo resistivo, y los materiales de detección más empleados son los óxidos metálicos, nanotubos de carbono, polímeros conductivos y nanopartículas de metal funcionalizadas con materiales orgánicos. Para el análisis de las respuestas de los sensores se aplica inicialmente un preprocesado de las señales, que consiste en la normalización de los datos y la reducción de la dimensionalidad de la matriz de datos. Con las variables seleccionadas tras este proceso, se construyen modelos de clasificación aplicando algoritmos de reconocimiento de patrones, que pueden ser no supervisados (p.e., PCA) o supervisados (p.e., RNA o SVM). En la selección del algoritmo a utilizar debe tenerse en cuenta el tamaño muestral, ya que en el caso de disponer de pocos datos los métodos supervisados suelen presentar problemas de overfitting.

En este estudio doctoral, para la identificación de biomarcadores del cáncer gástrico las muestras de aire exhalado se analizan con el sistema de GC-MS que se presenta en detalle en el próximo capítulo, y se desarrolla un sistema de olfato electrónico formado por sensores químicos de gases basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con diferentes compuestos orgánicos, cuya fabricación se presenta en el capítulo 4.



## CAPÍTULO 3

---

### ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO



---

### 3.1 MEDICIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la extracción de los analitos almacenados en los tubos preconcentradores de volátiles para su análisis por cromatografía de gases, se utiliza la desorción térmica. El concepto de *desorción térmica* o termo-desorción consiste en calentar el material adsorbente a una temperatura adecuada para la desorción de los COV de interés (generalmente, entre 80°C y 250°C).

El proceso de desorción térmica se puede realizar en un flujo de gas inerte, lo que permite extraer y transportar directamente los COV hacia el GC-MS de forma rápida y directa. Este proceso se conoce como *extracción dinámica* [88, 89]. Alternativamente, se puede aplicar la *extracción en fase sólida* (SPE), la cual utiliza una fase sólida que presenta diferente afinidad con los compuestos de la muestra, de modo que cuando se hace pasar la muestra a través de la fase sólida, algunos compuestos de interés quedan retenidos en ella mientras que otros pasan sin ser retenidos. Las características de este método lo hacen muy adecuado para la eliminación de interferencias, la preconcentración de analitos, y la conservación y transporte de la muestra [90]. Dentro de las técnicas de SPE se incluyen dos variantes: la *extracción con cartuchos* y la *microextracción en fase sólida* (SPME). Esta última es la más utilizada en GC-MS.

La SPME combina la extracción y concentración de los analitos de interés, y puede usarse en el espacio de cabeza de muestras volátiles [91]. La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico [92]. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa (figura 3.1).

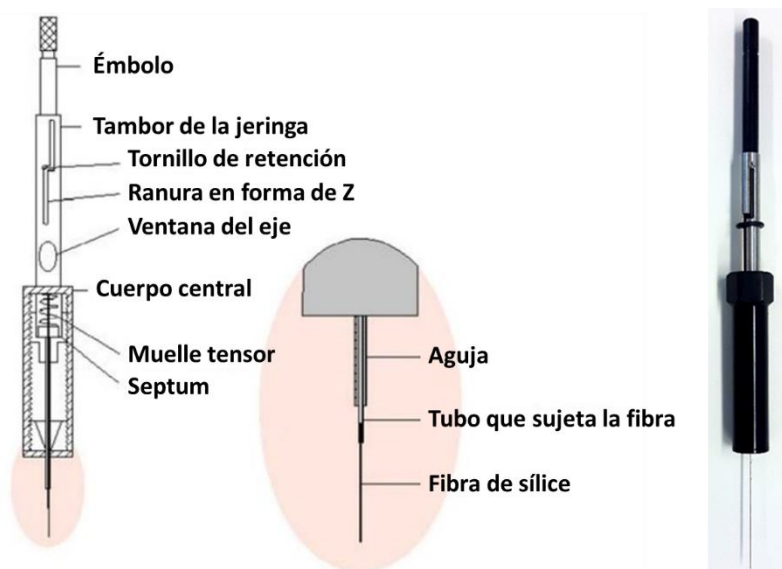


Figura 3.1 Esquema del dispositivo SPME. Adaptado de [93].

El principio de la SPME generalmente es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra [94]. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analitos ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra. En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas:

Primera etapa: *extracción*: el adsorbente de la fibra se pone en contacto con la muestra, con tiempo y temperatura controlados y predeterminados. En esta etapa se produce la migración de los analitos desde el espacio de cabeza de la muestra hasta la fibra, concluyendo cuando se produce el equilibrio entre ambos. Segunda etapa: *desorción*: se retiran los analitos retenidos en la fibra. En GC se emplea la desorción térmica para este propósito [95]. La figura 3.2 muestra una ilustración del proceso de SPME con extracción en el espacio de cabeza de la muestra e introducción de la muestra en el GC-MS.

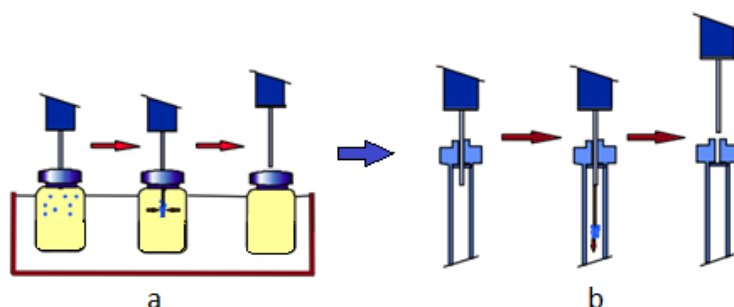


Figura 3.2 Esquema del proceso de SPME-GC: (a) HS-SPME; (b) Desorción térmica en GC. HS: Espacio de cabeza. Reproducido de [96].

El proceso de SPME se puede ver influenciado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción. Entre estas variables se encuentra la agitación de la muestra, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio de cabeza por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio. Otros parámetros importantes son el tiempo y la temperatura de extracción.

### 3.2 CROMATOGRAMAS

El *cromatograma* contiene la información analítica relativa a la muestra; éste es un registro gráfico que muestra la separación de compuestos mediante una cromatografía y representa la señal recogida por el detector en respuesta a la concentración del analito o los analitos de la muestra. El cromatograma puede ser diferencial, cuando la señal tiene varios picos que corresponden a los varios analitos de la muestra separados por la columna cromatográfica, o integral, cuando la señal corresponde a un solo componente de la muestra y se acumula (figura 3.3).

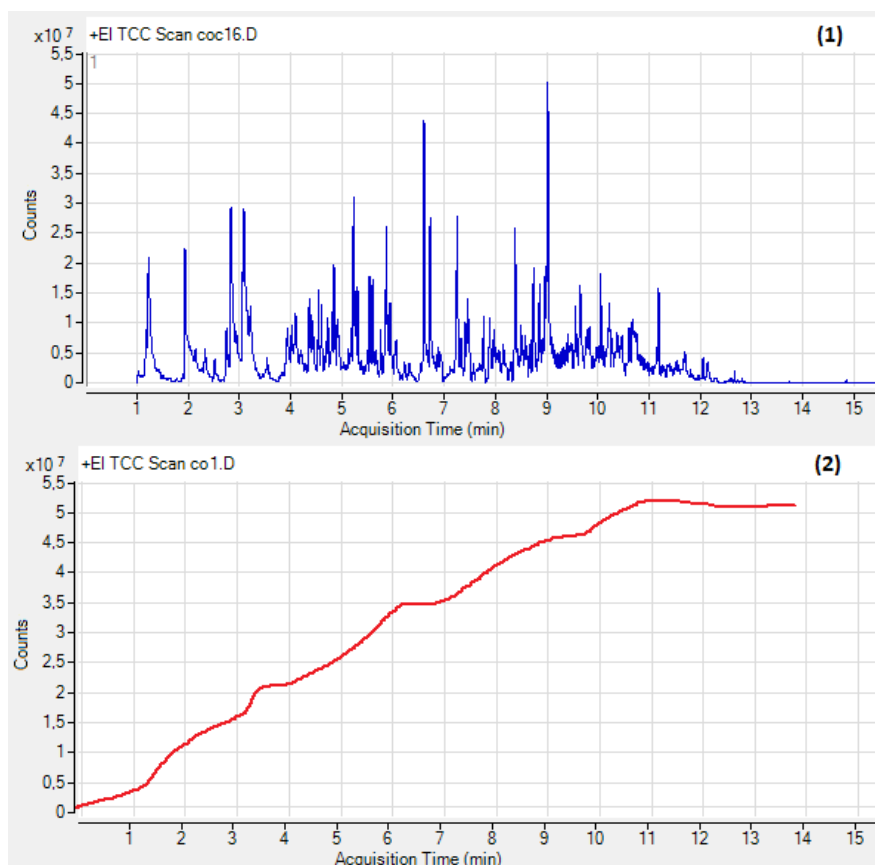


Figura 3.3 Tipos de cromatogramas: (1) Diferencial, (2) Integral

Los aspectos termodinámicos y cinéticos de la separación cromatográfica quedan reflejados en el cromatograma, es decir, en la situación y forma del pico. La figura 3.4 representa un ejemplo de cromatograma compuesto de 5 componentes y los parámetros que lo definen.

**Tiempo muerto ( $t_M$ )** : Es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido (mostrado como un pico de aire o de componente no retenido), siendo la escala del tiempo representada en minutos.

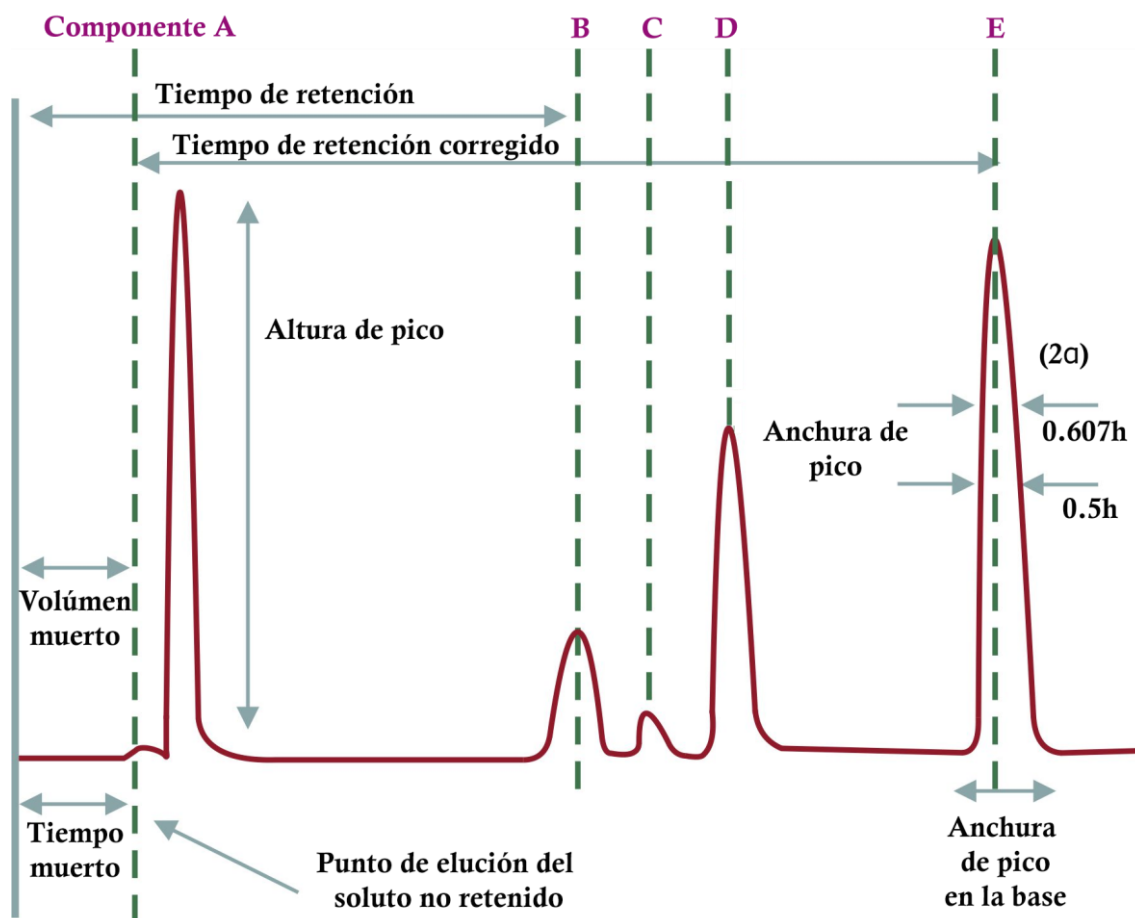


Figura 3.4 Cromatograma típico. Reproducido de [97].

**Volumen muerto ( $V_M$ ):** Es el volumen de fase móvil requerido para eluir un componente no retenido. Se puede calcular a partir del tiempo muerto y la velocidad de flujo  $f$  (expresada en  $\frac{ml}{min}$ ),

$$V_M = t_M * f \quad (1)$$

**Tiempo de retención ( $t_R$ ):** En cromatografía de gases, el tiempo de retención se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar  $t_R$  como un parámetro para identificación de los compuestos. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un

criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad. Los tiempos de retención absolutos de un compuesto dado se modifican de un cromatograma a otro.

**Pico:** El pico es la fracción del cromatograma que identifica la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna. El pico por lo general es definido por su área, altura y ancho a la mitad de la altura, o altura y ancho en la línea de base. Si la separación es incompleta, se puede registrar la elución de dos o más componentes como un pico no resuelto. La altura del pico es proporcional a la concentración del componente separado de la muestra.

**Volumen de residencia ( $D$ ):** el volumen de residencia (también conocido como volumen de demora en elución a gradiente) es el volumen entre el punto en el que se encuentran los eluyentes y la entrada de la columna.

**Volumen de retención ( $V_R$ ):** es el volumen requerido para la elución de un componente. Se puede calcular a partir del tiempo de retención y de la velocidad de flujo (expresada en  $\frac{ml}{min}$ ):

$$V_R = t_R * f \quad (2)$$

**Tiempo de retención relativo ( $TRR$ ):** También conocido como tiempo relativo no ajustado, es la relación entre los tiempos de retención de un pico  $t_{R2}$  con respecto a otro  $t_{R1}$  en un mismo cromatograma.

$$TRR = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (3)$$

**Factor de retención ( $K$ ):** Al factor de retención también se le conoce como el factor de capacidad, y se define como:

$$K = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (4)$$

**Factor de simetría ( $T$ ):** El factor de simetría de un pico (también conocido como factor de asimetría o factor de cola) se calcula como:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2\sigma} \quad (5)$$

donde  $W_{0.05}$  es el ancho del pico al 5% de la altura y  $\sigma$  es la distancia desde el máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde de la línea base.

La información extraída de un cromatograma puede ser de tipo *cuantitativo*, cuando se identifican sustancias y se determina su pureza, o *cuantitativo*, cuando se determina el número de componentes de la mezcla y la concentración del analito/s separado/s [98].

**Análisis cualitativo:** el parámetro que puede usarse con fines cualitativos en cromatografía es el *tiempo de retención*. Éste es característico de cada componente en cada sistema cromatográfico. Aunque únicamente con el tiempo de retención resulta difícil asegurar la presencia de un componente en una mezcla, sí se puede afirmar su ausencia. La identificación requiere siempre el uso de patrones en las mismas condiciones cromatográficas.

El método más adecuado para realizar un análisis cualitativo es la comparación directa de los parámetros de retención de los picos de la muestra con los de sustancias patrón (estándar), trabajando en ambos casos con el mismo sistema cromatográfico. A la hora de realizar las comparaciones, es conveniente utilizar determinados parámetros, que si bien no eliminan todas las posibilidades de variabilidad de los resultados, sí permiten al menos corregir la variabilidad inducida por determinadas condiciones. Los parámetros más utilizados son:

1. Tiempos o volúmenes de retención corregidos: tiempo real que la fase estacionaria ha retrasado el avance del compuesto.

2. Factores de capacidad: medida de la fuerza con la que la fase estacionaria retiene un soluto dado.

3. Tiempos de retención relativos.

Los parámetros 1 y 2 permiten corregir las diferencias de retención debidas a los volúmenes muertos de cada sistema. El parámetro 3 se define mediante la ecuación:

$$t_R = \frac{t}{t_p} \quad (6)$$

donde  $t$  es el tiempo de retención del compuesto que se trata de identificar y  $t_p$  el tiempo de retención de un compuesto que se toma como patrón [99].

**Análisis cuantitativo:** se basa en la comparación del área o altura de *pico* del componente de interés con la de estándares de esta sustancia de concentración conocida, teniendo en cuenta la relación lineal entre el área o altura de pico y la concentración en un determinado intervalo de concentraciones. Para obtener resultados exactos, en los análisis basados en altura de pico se requiere que la anchura de los picos permanezca sin cambios durante el tiempo requerido para la obtención de los cromatogramas de la muestra y los estándares. Por ello suele usarse mucho más el análisis basado en área de pico, parámetro independiente de los efectos de ensanchamiento.

Existen varios métodos que permiten medir las áreas bajo los picos cromatográficos, uno de ellos es la "altura por la mitad del ancho", el cual consiste en medir el ancho del pico cromatográfico a la mitad de su altura  $w_{\frac{1}{2}}$ , y multiplicarlo por su altura (ecuación 7). La aplicación de este método es útil para picos de forma aproximadamente gaussiana, pero los resultados son menos satisfactorios para picos no simétricos o para picos pequeños y anchos.

$$A = w_{\frac{1}{2}} * h \quad (7)$$

---

### 3.3 PROCESAMIENTO DE DATOS CROMATOGRÁFICOS

El procesamiento de datos en cromatografía incluye tres etapas:

1. Colectar y procesar la señal proveniente del detector para generar un cromatograma y la información correspondiente como área de los picos, tiempos de retención y ancho de picos.
2. Colectar y analizar los datos para obtener información cualitativa.
3. Optimizar los parámetros cromatográficos.

*Detección:* el *detector* es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. El detector debe ser sensible a los efluentes de la columna y capaz de suministrar un registro de la cromatografía en forma de un cromatograma. La señal del detector debe ser proporcional a la cantidad de cada analito, para poder realizar un análisis cuantitativo.

La señal proveniente del detector se transmite a un sistema de registro e integración, el cual genera un cromatograma que representa un registro del análisis. En la mayor parte de los casos, el sistema integra automáticamente el área de cada pico (figura 3.5), y aporta los resultados cuantitativos y los tiempos de retención. Para el desarrollo y análisis de estos casos, se puede emplear un software apropiado más sofisticado, entre los cuales se destacan el software de “ChemStation” o el paquete “Unkonowns Analysis” del software “MassHunter Quantitative Analysis”, de Agilent Technologies. Si las señales presentan varios picos solapados, el paso a realizar es la deconvolución de los picos.

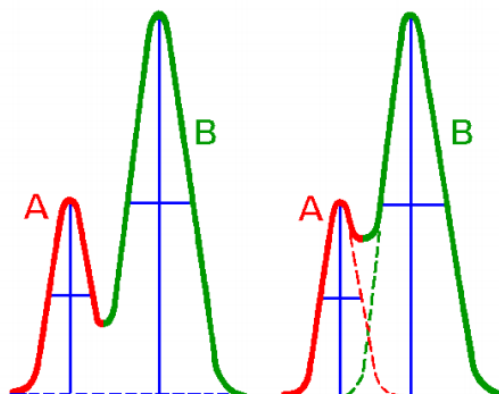


Figura 3.5 Detección de picos.

El siguiente paso consiste en la identificación de compuestos, empleando librerías de espectros, las cuales permiten realizar una comparación entre la información contenida en éstas y los espectros experimentales adquiridos. En la tabla 3.1 se presentan algunas de ellas.

Tabla 3.1 Librerías para la identificación de compuestos.

Nombre	Licencia	Características
NIST	Privada	Es la más completa. La más nueva versión es NIST17, con más de 400.000 valores de índice de retención para casi 100.000 metabolitos.
Fiehn LECO-Fiehn Agilent	Privada	Contiene más de 1000 metabolitos
GOLM	Pública	Acceso gratuito bajo términos de uso. Enfocada en alcanos.

### 3.4 BIOMARCADORES

Un *biomarcador de aliento*, es un compuesto químico producido de forma endógena dentro del cuerpo o introducido de forma exógena en el organismo, que puede detectarse y medirse en la respiración exhalada, y sirve como indicador para diferenciar entre el estado normal y anormal del cuerpo [14].

Para la identificación de biomarcadores se emplean métodos estadísticos. La selección de la técnica de análisis más apropiada ha de hacerse tomando en cuenta distintos aspectos relativos al diseño del estudio y a la naturaleza de los datos que se quieren analizar. El número de grupos de observaciones a comparar, la naturaleza de las mismas (según se trate de muestras independientes u observaciones repetidas sobre los mismos individuos), el tipo de datos o su distribución de probabilidad, son elementos determinantes a la hora de escoger la técnica estadística más apropiada a utilizar [100].

Si la distribución de los datos es normal y se cumplen algunas otras condiciones, se utilizan los denominados test paramétricos, y si no se cumplen dichos criterios se aplican los llamados test no paramétricos o de distribución libre. Las pruebas no paramétricas son menos potentes, es decir, son más exigentes al rechazar la hipótesis nula de igualdad, y por tanto tienen menos posibilidades de acertar cuando no la rechazan (más posibilidades de cometer un error). Por otro lado, la potencia de un test estadístico aumenta cuando el tamaño de la muestra es mayor. De esta forma, para conseguir la misma potencia con una prueba no paramétrica, se necesita aumentar el tamaño de la muestra en una cantidad determinada.

En el análisis de datos cuantitativos, los métodos estadísticos más conocidos y utilizados en la práctica, como el *test t de Student* o el análisis de la varianza, se basan en asunciones que no siempre son verificadas por los datos de los que se dispone. Así, es frecuente tener que asumir que la variable objeto de interés sigue por ejemplo una distribución gaussiana o normal. Cuando la ausencia de normalidad es obvia, o no puede ser totalmente asumida por un tamaño muestral reducido, suele recurrirse a una transformación de la variable de interés (por ejemplo, la transformación logarítmica) para simetrizar su distribución o bien justificar el uso de las técnicas habituales recurriendo a su robustez (esto es, su escasa sensibilidad a la ausencia de normalidad). Existen a su vez otros métodos, no paramétricos, como, por ejemplo, el *test de Wilcoxon*, que no requiere de este tipo de hipótesis sobre la distribución de los datos, y puede

calcularse incluso con tamaños de muestras reducidos. A continuación, se describen algunos de estos métodos estadísticos.

- Test t de Student para datos con distribución normal

Con el seudónimo de estudiante (Student), William Sealy Gosset desarrolló la prueba t de student [101]. Esta prueba es muy útil para comparar dos muestras de tamaño reducido ( $\leq 30$  datos). Se trata de un test paramétrico, que parte de la suposición de que la variable analizada en el conjunto de la población sigue una distribución como la de la campana de Gauss. Se especifica el nivel de la probabilidad ( $p$ ) que se esté dispuesto a aceptar para determinar que la diferencia entre dos grupos es significativa. El nivel de probabilidad ha de ser menor que el valor de significación ( $\alpha$ ). Comúnmente se establece  $\alpha = 0.05$ . La primera presunción es formular la hipótesis nula, que establece que no hay diferencias en la media de las dos muestras independientes y que, de existir esta diferencia, sólo se debe al azar [102]. Existen factores que contribuyen para indicar si la diferencia entre dos medias de los grupos se puede considerar significativa:

- Cuanto mayor es la diferencia entre las dos medias, mayor es la probabilidad de que se presente una diferencia estadística significativa.
- El tamaño de la muestra es extremadamente importante en la determinación de la significación de la diferencia entre las medias. Aumentando el tamaño de la muestra, las medias tienden a ser más estables y más representativas.
- Un nivel más grande de la alfa requiere menos diferencia entre las medias.

- Prueba de Wilcoxon para muestras dependientes

Se aplica en *muestras dependientes*, por ejemplo, los mismos sujetos antes y después de realizar una prueba. No necesita una distribución específica de los datos, y se utiliza

para comparar dos mediciones de rangos (medianas) y determinar que la diferencia no se deba al azar, y sea estadísticamente significativa. Este test contrasta la hipótesis nula de que la muestra procede de una población en la que la magnitud de las diferencias positivas y negativas entre los valores de las variables es la misma.

- Prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes

Esta prueba fue originalmente propuesta por Wilcoxon en (1945) para el caso de muestras de tamaños iguales. Mann y Whitney (1947) extendieron el procedimiento al caso de tamaños muestrales desiguales, y proporcionaron tablas para poder utilizar el procedimiento con muestras pequeñas. Se usa cuando se quiere comparar dos poblaciones usando *muestras independientes*, y es una prueba alternativa a la prueba t de Student para comparar dos medias usando muestras independientes. También es conocida como la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. La hipótesis nula es que las medianas de las dos poblaciones son iguales y la hipótesis alternativa puede ser que la mediana de la población uno sea distinta (mayor o menor) de la mediana de la población dos.

---

### 3.5 CONCLUSIONES

Para el análisis cromatográfico de las muestras de aliento, es necesario calentar el material adsorbente utilizado para la preconcentración y almacenamiento de los volátiles del aliento. Este proceso produce la desorción térmica de los COV retenidos por el material adsorbente, que forman un espacio de cabeza dentro de un contenedor cerrado. La técnica de SPME suele utilizarse comúnmente para captar y concentrar los COV del espacio de cabeza, y luego inyectarlos en el puerto del cromatógrafo de gases para su análisis cromatográfico. Los cromatogramas que proporciona el GC-MS permiten

identificar y cuantificar los compuestos constituyentes de la muestra. Para la identificación de los compuestos se usa el tiempo de retención y se emplean librerías de espectros disponibles comercialmente, la más completa en la actualidad siendo la NIST, mientras que para hallar la concentración de los compuestos se usa el área o la altura de los picos cromatográficos. Finalmente, aplicando un análisis estadístico apropiado para comparar entre los niveles de los compuestos encontrados en el aliento de los voluntarios que forman los grupos de pacientes y de controles, que se selecciona en función del tamaño y la distribución de la muestra, se llega a la identificación de los biomarcadores de la enfermedad. El análisis cromatográfico se emplea en el capítulo 5 de esta tesis para encontrar posibles biomarcadores de cáncer gástrico en el aliento exhalado.





## CAPÍTULO 4

---

### DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA MULTISENSORIAL



#### 4.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

Para el propósito de esta tesis doctoral, se desarrolló un sistema multisensorial de olfato electrónico formado por una matriz de sensores de gases basados en nanopartículas de oro (AuNP) funcionalizadas con diferentes compuestos orgánicos como material sensible de detección de los sensores; estos materiales han demostrado un excelente potencial para detectar concentraciones muy bajas de COV en muestras de biofluidos [103]. En este tipo de nanomateriales, las AuNP aseguran la conducción eléctrica a través del nanomaterial cuando es aplicado un voltaje a los electrodos del sensor, mientras que los compuestos orgánicos reaccionan física y/o químicamente con los COV de la muestra.

Los sustratos que se utilizaron para fabricar los sensores se muestran en la figura 4.1. Se fabricaron sobre una oblea de silicio de 2 pulgadas, de tipo p, con una resistividad de 10-20  $\Omega$  por centímetro, con orientación <100>, de 275  $\mu\text{m}$  de espesor, pulida en una cara. Por oxidación térmica a 1100°C, se formó una capa de  $\text{SiO}_2$  de 200 nm de grosor en la superficie del silicio. A continuación se definieron dos electrodos de oro paralelos que se depositaron utilizando fotorresistencia fina positiva y litografía láser, que presentan una separación entre sí de 15  $\mu\text{m}$  en la zona activa donde se deposita el material sensible. Se depositó por sputtering una película de oro de 200 nm de grosor, y el oro que quedó fuera del área que define los electrodos fue eliminado mediante un proceso de lift-off con acetona.



Figura 4.1 Representación esquemática de los sustratos de los sensores.

## 4.2 FABRICACIÓN DE LOS MATERIALES SENSIBLES DE LOS SENSORES

El método de elaboración convencional de nanopartículas de oro funcionalizadas con compuestos orgánicos se basa en procesos de química húmeda, que pueden dejar rastros de impurezas y compuestos residuales en el material sensible de los sensores, y por consiguiente influir en la detección de los COV [104]. Como método alternativo para obtener una alta pureza de estos nanomateriales, el proceso de fabricación que se utilizó en este estudio comprendió dos etapas:

En la **primera etapa**, las AuNP se sinterizaron y se depositaron en la zona del área activa los sustratos de los sensores mediante el uso de la técnica de deposición en fase de gas avanzada (*Advanced Gas Deposition* o AGD, por su abreviación en inglés) [105]. El equipo de AGD se muestra en la figura 4.2; está formado por una cámara de evaporación (inferior) y una cámara de depósito (superior).

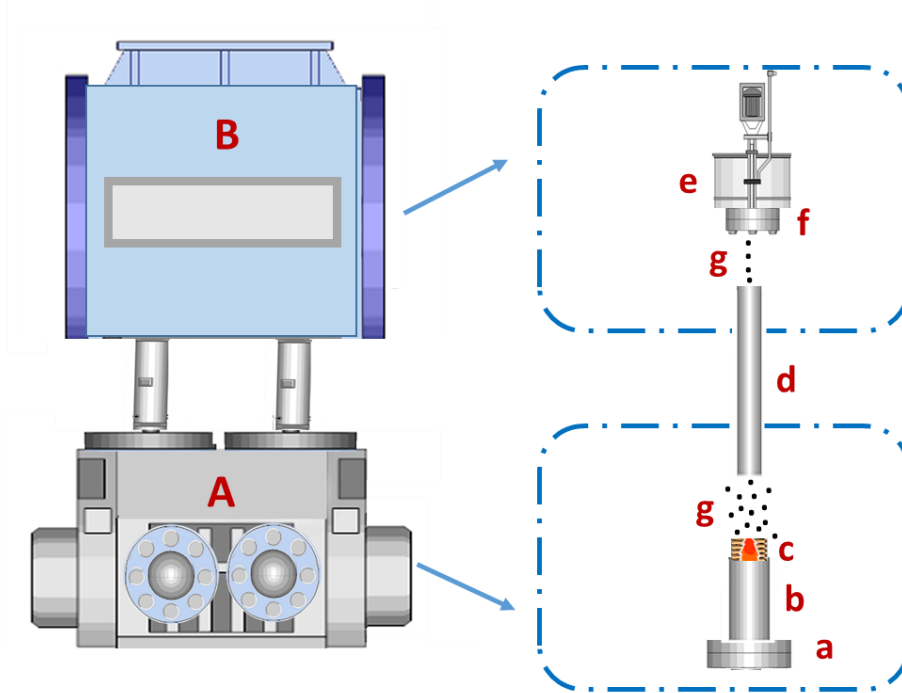


Figura 4.2 Técnica de deposición en fase de gas avanzada (AGD) utilizada para la fabricación y deposición de AuNP. (A)Cámara de evaporación; (B)Cámara de deposición; (a)Soporte; (b)Crisol; (c)Pieza de oro incandescente; (d)Tubo de transferencia; (e)Soporte móvil; (f)Sustrato del sensor; (g)Nanopartículas de oro.

Para la fabricación de las AuNP, se ubicó una pieza de oro de alta pureza (99.999%) encima de un crisol de carbono dentro de la cámara de evaporación, y ambas cámaras del AGD se evacuaron por medio de unas bombas de vacío hasta que la presión de ambas alcanzó un valor inferior a 0.02 mbar, para garantizar condiciones de sinterización y deposición muy limpias. A la bobina de inducción de cobre que rodea el crisol se le aplicó la potencia adecuada (4 kW) para proporcionar el calentamiento necesario para fundir y evaporar el oro. De este modo, átomos de oro se desprendieron de la superficie de la pieza de metal. Se introdujo un flujo laminar de un gas de alta pureza, He, a una velocidad de flujo de 20 l/min, por debajo de la pieza de oro incandescente, y este flujo de gas, con dirección ascendente, transportó el vapor de metal mientras lo enfrió, de modo que, por condensación, inicialmente se formaron clústeres de átomos de Au, y posteriormente nanopartículas de Au individuales.

Las presiones en las cámaras de evaporación y deposición se ajustaron a ~88 mbar y ~0,8 mbar, respectivamente, y se posicionó el tubo de transferencia (3 mm de diámetro) que conecta las dos cámaras del equipo, en la región de vapor donde se forman las AuNP individuales. Debido a la gran diferencia de presión entre las dos cámaras del AGD, las nanopartículas de oro fueron transportadas a gran velocidad a la cámara de deposición, evitando así la aglomeración de ellas, y quedaron fuertemente adheridas a los sensores colocados boca abajo encima de un soporte móvil que se mueve dentro de la cámara de deposición.

Ajustando la velocidad de desplazamiento del soporte móvil a la velocidad máxima permitida por el sistema, de 0.04 mm/s, y pasando una sola vez los sensores por la dirección del flujo de las nanopartículas de oro que llegaban desde la cámara de evaporación, se consiguió la deposición de nanopartículas de oro dispersas, sin llegar a formar una película continua entre los electrodos de los sensores, tal como se muestra en la figura 4.3. El tamaño promedio de las nanopartículas depositadas fue de ~10 nm.

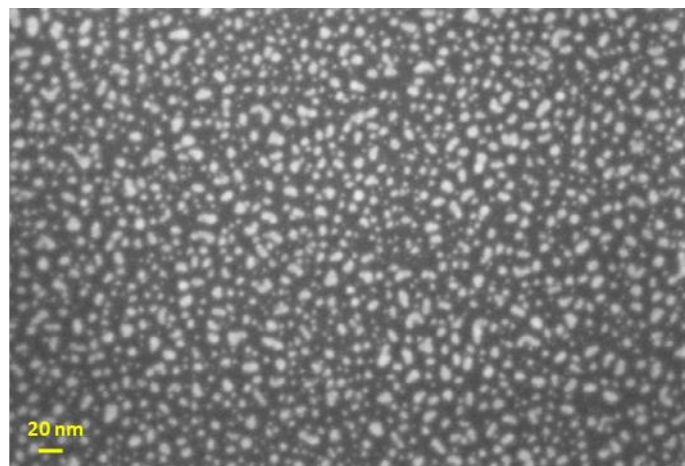


Figura 4.3 Imagen de microscopía electrónica de barrido (*Surface Electron Microscopy* o SEM, por su abreviación en inglés) de las AuNP de oro depositadas por AGD.

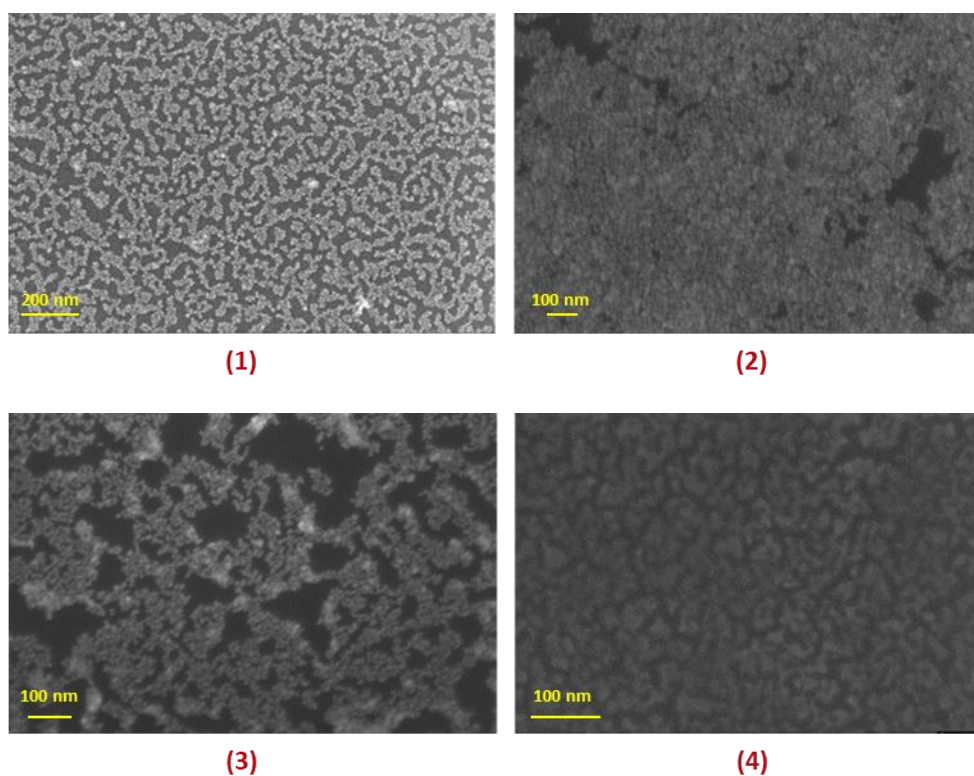
En la **segunda etapa** de fabricación, las AuNP fueron funcionalizadas con compuestos orgánicos que contienen un grupo tiol o un grupo amino, con alta probabilidad de unión a las AuNP debido a su fuerte afinidad con el oro [106, 107]. Los compuestos orgánicos utilizados fueron:

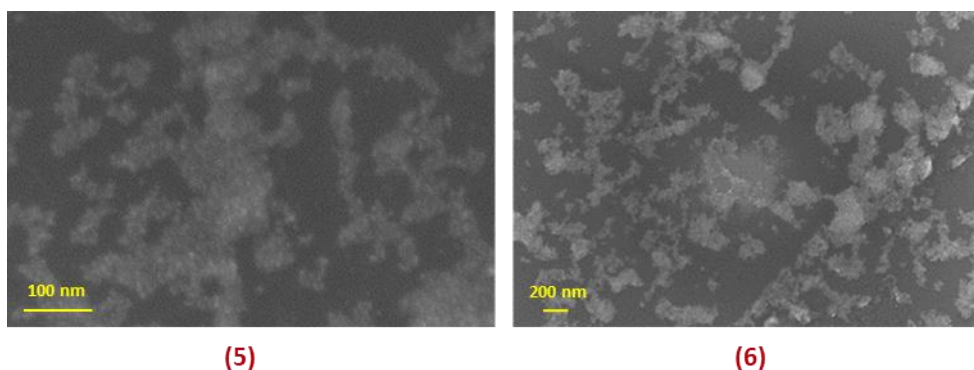
- Butanotiol:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{SH}$
- Decanotiol:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SH}$
- 4-Metoxi- $\alpha$ -toluenotiol:  $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{SH}$
- 2-Mercaptobenzoxazol:  $\text{C}_7\text{H}_5\text{NOS}$
- Ácido 11-mercaptoundecanoico:  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$
- Octadecilamina:  $\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{N}$

La selección de estos compuestos se efectuó teniendo en cuenta una afinidad física y/o química con un amplio rango de compuestos orgánicos volátiles que pueden estar presentes en el aliento. De este modo, butanotiol y decanotiol tienen una terminación no polar, y reaccionan preferiblemente con compuestos no polares; 4-metoxi- $\alpha$ -toluenotiol y 2-mercaptobenzoxazol poseen anillos aromáticos, y tienen alta afinidad hacia los compuestos aromáticos; ácido 11-mercaptoundecanoico contiene una

terminación polar, y una buena afinidad con los compuestos polares; mientras octadecilamina tiene alta afinidad hacia los hidrocarburos alifáticos de cadena larga.

Para lograr la funcionalización, se disolvieron los compuestos orgánicos en etanol por agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, utilizando para ello un agitador magnético, para asegurar la homogeneidad de la solución. El solvente seleccionado es convenientemente volátil y se evapora rápidamente a baja temperatura, por lo tanto, es excelente para aplicaciones que requieren alta pureza tras la evaporación [108]. Los sensores con las AuNP dispersas previamente depositadas se sumergieron en la solución durante 1 hora, y el solvente se evaporó posteriormente por calentamiento a 50°C durante 1 hora en un horno convencional. La morfología de los nanomateriales fabricados en este estudio se muestra en la figura 4.4. Tal como se puede ver en esta imagen, las nanoparticulas de oro son enlazadas por los compuestos orgánicos, formando una red que une los dos electrodos de los sensores.





(5)

(6)

---

Figura 4.4 AuNP funcionalizadas con compuestos orgánicos.  
(1)Butanotiol (2)Decanotiol (3)4-metoxi- $\alpha$ -toluenotiol (4)2-mercaptobenzoxazol (5)Ácido 11-mercaptoundecanoico (6)Octadecilamina.

---

Los compuestos orgánicos empleados para funcionalizar las nanopartículas de oro presentaron características muy distintas, y en consecuencia se observaron diferencias significativas en las nanoestructuras formadas y el cubrimiento de la superficie del sensor, dependiendo del compuesto utilizado, tal como lo demuestran las imágenes SEM presentadas en la figura 4.3. A continuación se presenta un resumen de las características morfológicas de cada nanomaterial sensible fabricado:

- AuNP funcionalizadas con butanotiol: nanoestructura muy ordenada y cubrimiento medio de la superficie del sensor
- AuNP funcionalizadas con decanotiol: red muy densa de nanopartículas estrechamente enlazadas y alto cubrimiento de la superficie del sensor
- AuNP funcionalizadas con 4-metoxi- $\alpha$ -toluenotiol: nanoestructura en forma de nanopartículas enlazadas y recubrimiento medio-bajo de la superficie del sensor
- AuNP funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol: nanoestructura en forma de clústeres ordenados y cubrimiento medio-alto de la superficie del sensor
- AuNP funcionalizadas con ácido 11-mercaptoundecanoico: agrupaciones de nanopartículas estrechamente enlazadas y cubrimiento bajo de la superficie del sensor
- AuNP funcionalizadas con octadecilamina: agrupaciones de nanopartículas enlazadas y cubrimiento bajo de la superficie del sensor

Al ser menos propicio el enlazamiento de las nanopartículas de oro mediante los compuestos con cadenas largas de átomos de carbono como octadecilamina y ácido 11-mercaptoundecanoico, el cubrimiento de la superficie del sensor con estos nanomateriales fue bajo. Los compuestos con anillo aromático no polar y grupo tiol (4-metoxi- $\alpha$ -toluenotiol y 2-mercaptobenzoxazol) y los compuestos con cadena no polar de carbono y grupo tiol (butanotiol y decanotiol) promovieron la formación de buenos enlaces con las nanopartículas de oro y la formación de nanoestructuras con tendencia generalmente ordenada y un buen cubrimiento de la superficie del sensor.

---

### 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SENSORES Y OPERACIÓN DEL SISTEMA MULTISENSORIAL

Para la caracterización de los sensores, se midió inicialmente la resistencia eléctrica entre los electrodos de los sensores después de la deposición de las AuNP, lo que confirmó que tras este proceso no hubo formación de contacto eléctrico entre los electrodos. Después de la funcionalización de las AuNP con los compuestos orgánicos, todos los sensores midieron resistencias en el rango de los  $k\Omega$  o  $M\Omega$  (tabla 4.1), que son valores ideales para los sensores químicos de gases.

En las nanoestructuras formadas por AuNP enlazadas mediante compuestos orgánicos, la conducción eléctrica a través del nanomaterial es proporcionada por el mecanismo de efecto túnel de los electrones que atraviesan la red que forman las nanopartículas y el compuesto orgánico. Las AuNP proporcionan la carga de los electrones, y el transporte de los electrones se realiza mediante saltos entre nanopartículas cercanas pasando a través del compuesto orgánico [109, 110].

Tabla 4.1 Resistencia eléctrica de los sensores fabricados. En algunos casos se han fabricado dos sensores con el mismo nanomaterial, para comprobar la diferencia entre varias deposiciones.

No. del sensor	Resistencia	Compuesto orgánico
1	69.8 MΩ	2-Mercaptobenzoxazol
2	191 kΩ	4-Metoxi-α-toluenotiol
3	445 kΩ	Decanotiol
4	38 MΩ	Octadecilamina
5	1.7 kΩ	2-Mercaptobenzoxazol
6	1.8 kΩ	Ácido 11-mercaptoundecanoico
7	30.7 kΩ	2-Mercaptobenzoxazol
8	37 MΩ	Butanotiol
9	4.02 MΩ	Decanotiol
10	5.7 MΩ	Octadecilamina

Los sensores fueron incorporados en una *cámara de medidas* de teflón con un volumen interior de 26 cm<sup>3</sup>, que se muestra en la figura 4.5. La cámara incluye en su cara superior dos conectores, uno de ellos permite la inyección de los volátiles que provienen de la muestra y el otro funciona como salida de la muestra. También se utilizan para pasar aire sintético a través de la cámara después de la realización de cada medida, para la purga tanto de la cámara como de la superficie de los sensores.

Para la operación de los sensores, se optó por aplicar alternativamente a cada uno de ellos pulsos de voltaje de corta duración. Este método de operación proporciona un *funcionamiento dinámico* de los sensores entre los estados ON (aplicación de voltaje) y OFF (sin voltaje), sin llegar al estado estacionario, y confiere más información que el modo estático de operación [111].

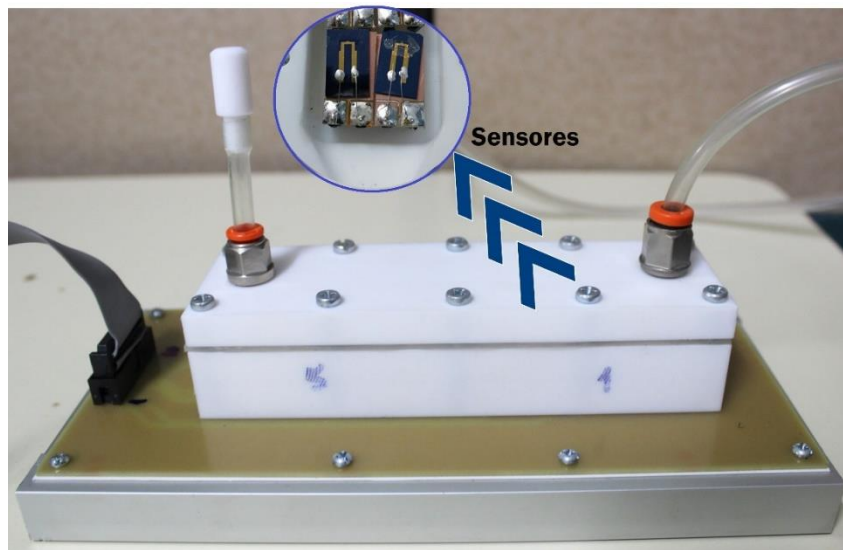


Figura 4.5 Cámara de medidas. En la parte superior de la figura se muestran dos de los sensores integrados en la cámara.

En la figura 4.6 se aprecia la corriente eléctrica de uno de los sensores durante 6 ciclos sucesivos de operación a un voltaje de 5 V, con un funcionamiento (aplicación de voltaje) de 10 segundos por ciclo, seguido de una pausa de 90 segundos entre ciclo y ciclo (no representada en la figura 4.6), durante la cual los otros nueve sensores que conforman la nariz electrónica fueron alimentados sucesivamente al voltaje de 5 V. Este proceso hizo que la corriente a través del sensor variara durante cada ciclo de operación entre dos valores, sin llegar a un valor estable. Además se puede notar la muy buena repetitividad del comportamiento del sensor durante los 6 ciclos de operación.

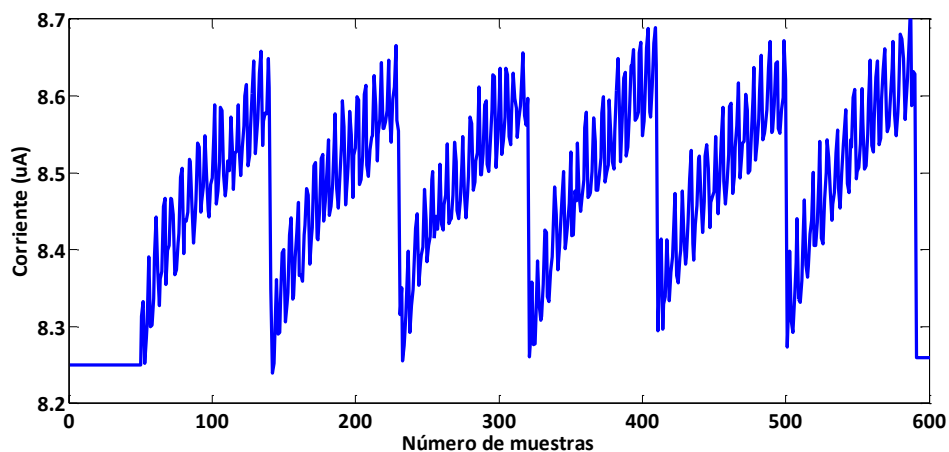


Figura 4.6 Corriente eléctrica del sensor 3, basado en AuNP funcionalizadas con 1-decanotiol, adquirida durante seis ciclos de operación del sensor.

El sistema de medida está conformado, además de la cámara de medidas con la matriz de sensores, por una *fente de potencia de alta precisión* (B2902A Precision Source, Keysight Technologies, Hungría), que proporciona el voltaje necesario para la operación de los sensores, un *equipo de adquisición de datos de alta resolución* (34972A LXI Data Acquisition Switch Unit, Keysight Technologies, Hungría), para la adquisición de las señales de los sensores, y un *ordenador* cuyas funciones cubren las tareas de procesado y análisis de las señales eléctricas. En la figura 4.7 se presenta el esquema del sistema, en el cual se distinguen los distintos módulos que lo conforman.

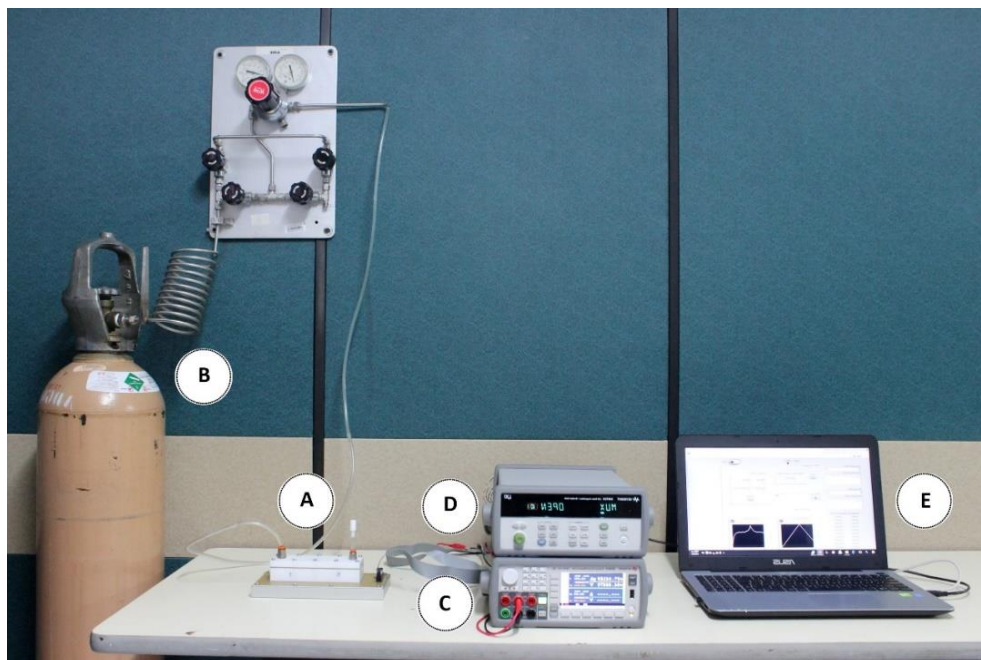


Figura 4.7 Esquema general del sistema de medidas. (A) Cámara de medidas (B) Bombona de aire sintético utilizado para el proceso de purga (C) Fuente de potencia de alta precisión B2902A (D) Equipo de adquisición de datos de alta resolución 34972A LXI (E) Ordenador.

#### 4.4 PRUEBAS INICIALES

Se efectuaron pruebas iniciales con el sistema multisensorial, presentadas a continuación, para determinar el comportamiento de los sensores ante muestras reales

de aliento. El objetivo de estas pruebas fue por un lado evaluar cuál puede ser el tiempo idóneo de almacenamiento de las muestras de aliento en el dispositivo de muestreo Bio-VOC a partir de las respuestas de los sensores, y por otro lado investigar la posibilidad de discriminar entre diferentes clases de sujetos a partir de las respuestas de los sensores ante la exposición a muestras de aliento.

---

#### 4.4.1 EVALUACIÓN DEL ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En esta etapa se buscó evaluar la capacidad y el tiempo de conservación de los volátiles del aliento recolectado en el sistema de muestreo Bio-VOC. Para ello se adquirieron dos muestras del mismo voluntario (denominadas a continuación *muestra A* y *muestra B*), tal como se muestra en la figura 4.8. La muestra A fue transferida de inmediato después de su adquisición a la cámara de sensores, mientras la muestra B permaneció durante 15 minutos dentro del sistema de muestreo antes de traspasarla a la cámara de medidas.



---

Figura 4.8 Toma de muestra para evaluar el almacenamiento de la misma.

---

Los sensores fueron operados en modo dinámico tal como se menciona en la sección anterior de este capítulo, con la diferencia de que se utilizó un solo ciclo de operación por sensor, y se representó en una misma gráfica la respuesta de los sensores a las dos muestras de aliento (figura 4.9). Analizando la corriente eléctrica de los sensores ante la exposición a las dos muestras (que tuvo lugar entre los puntos de muestreo 90 y 180 de la gráfica representada en la figura 4.9), se refleja la variabilidad de la concentración de los volátiles dada por la diferencia de amplitud de la corriente eléctrica del sensor, lo que sugiere que mantener la muestra en el Bio-VOC antes de traspasarla a la cámara de medidas resulta no ser adecuado, ya que los COV tienden a escaparse.

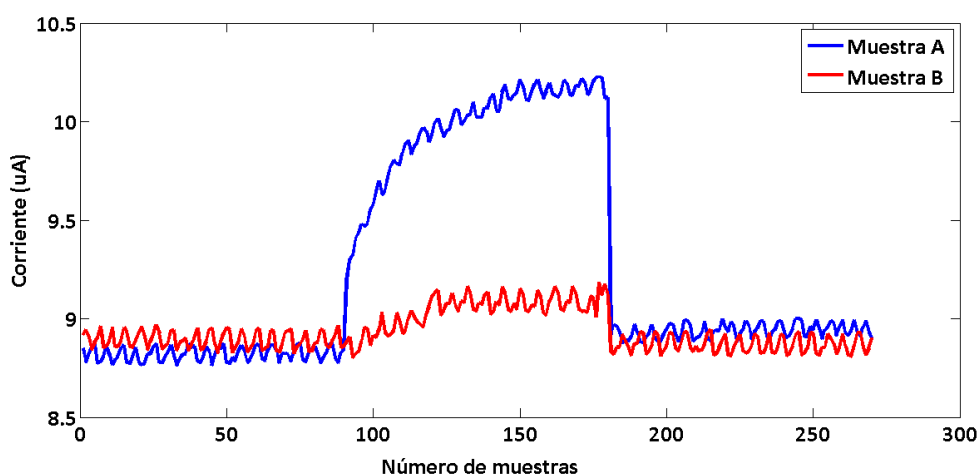


Figura 4.9 Respuesta eléctrica del sensor 8 (basado en AuNP funcionalizadas con butanotiol), comparativa entre las dos muestras A y B.

En la respuesta del sensor a la muestra de aliento, el compuesto orgánico proporciona sitios de adsorción para los COV del aliento, y la conductancia del nanomaterial sensible se modifica al adsorberse los COV del aliento en el compuesto orgánico [112, 113]. El incremento de la corriente eléctrica a través del sensor puede explicarse por el encogimiento que sufre el nanomaterial, causado por la adsorción de los COV del aliento en el nanomaterial, lo que produce un acercamiento de las nanopartículas de oro y un aumento de la transferencia de los electrones entre las nanopartículas [113, 114]. El efecto de encogimiento es reversible cuando la muestra del aliento es evacuada de la cámara de los sensores, lo que lleva a la recuperación de

las características eléctricas iniciales del sensor, tal como se observa en el tramo final de la gráfica presentada en la figura 4.9.

---

#### 4.4.2 DISCRIMINACIÓN ENTRE FUMADORES Y NO FUMADORES

Una vez caracterizados los sensores y optimizado el protocolo de medición de muestras, se realizaron pruebas preliminares del sistema en general. La finalidad de estas pruebas se enfocó en comprobar la funcionalidad del sistema; para ello se analizaron un total de 10 muestras de aliento exhalado recolectadas de un grupo de fumadores (5 sujetos) y un grupo de no fumadores (5 sujetos), así como una muestra de aire ambiente. Para evitar la influencia de posibles factores externos en los resultados del análisis, en este estudio se incluyeron solo sujetos varones, con edades comprendidas entre 28 y 35 años (a excepción de un único voluntario, fumador, de 55 años de edad), sin patologías conocidas y sin seguir ningún tipo de tratamiento médico. Las muestras de aliento se recolectaron con el dispositivo Bio-VOC a primera hora de la mañana con los voluntarios en ayunas y sin haber fumado desde la noche anterior, y se introdujeron de inmediato a la cámara de medidas para ser analizadas por los sensores de gases.

Se utilizó un solo ciclo de operación por sensor, y cada medida comprendió los siguientes pasos: (i) 5 minutos en condiciones estacionarias (en el aire ambiental que se encuentra normalmente dentro de la cámara de medidas); (ii) 5 minutos de exposición a la muestra analizada en condiciones estacionarias, obtenidas tapando los dos conectores de la cámara de medidas una vez introducida la muestra en la cámara; (iii) 5 minutos bajo flujo continuo de aire seco sintético, a un caudal de 1 L/min, utilizado para limpiar la superficie de los sensores y purgar la cámara de medidas.

Al analizar las respuestas de los sensores a las muestras de aliento exhalado, se evidenció que cuatro de ellos (los sensores 3, 4, 8 y 9, según la tabla 4.1) mostraron diferencias significativas en sus respuestas hacia los voluntarios fumadores y no fumadores, respectivamente, y una buena recuperación después de la evacuación de las muestras, mientras que las respuestas de los demás sensores no presentaron diferencias significativas, tal como se evidencia en la figura 4.10.

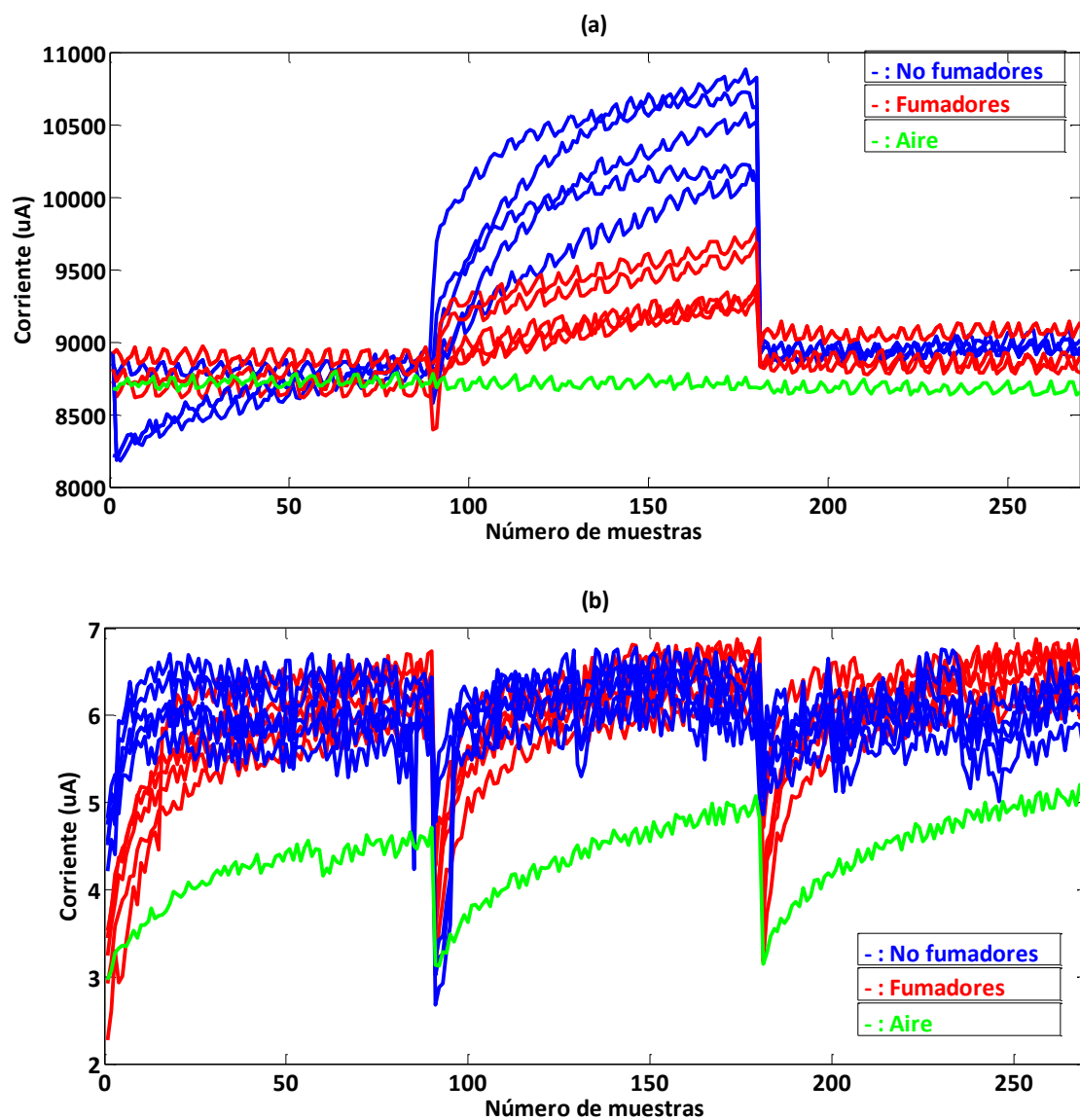


Figura 4.10 Respuesta eléctrica a la respiración exhalada de los 5 voluntarios fumadores y 5 voluntarios no fumadores obtenida por: (a) Sensor 3, basado en AuNP funcionalizadas con 1-decanotiol; (b) Sensor 1, basado en AuNP funcionalizadas con 2-mercaptobenzoxazol.

Por otro lado, las respuestas de todos los sensores a la muestra de aire fueron mucho más bajas en comparación con las respuestas a las muestras de aliento, lo que corrobora la observación presentada en la figura 4.9, donde se evidencia que al escaparse los volátiles del aliento del dispositivo Bio-VOC tras un almacenamiento prolongado de la muestra, la respuesta de los sensores es mucho más baja que al analizar la muestra de inmediato tras su recolección.

Los materiales sensibles de los sensores que presentaron mayores diferencias entre los sujetos fumadores y no fumadores están formados por AuNP funcionalizadas con decanotiol (2 sensores), butanotiol (1 sensor) y octadecilamina (1 sensor), con afinidad hacia los hidrocarburos no polares y alifáticos, que se encuentran presentes en el humo de los cigarrillos [115].

Para efectuar un análisis más detallado de la discriminación entre las muestras analizadas, se aplicó el método no supervisado de reconocimiento de patrones PCA, proyectando en un plano de dos dimensiones los datos de los cuatro sensores que presentaron mayores diferencias entre los voluntarios fumadores y no fumadores (los sensores 3, 4, 8 y 9, según la tabla 4.1), con el objetivo de examinar gráficamente si existe una discriminación entre las clases estudiadas. Para construir el modelo PCA, se utilizó un solo parámetro por sensor, que correspondió a la corriente media a través del sensor durante la exposición del sensor a la muestra (calculada entre los puntos de muestreo 90 y 180 de la gráfica representada en la figura 4.10). La matriz de datos, formada por 11 filas (que corresponden a las 11 muestras medidas) y 4 columnas (que corresponden a los 4 parámetros extraídos de las respuestas de los cuatro sensores) fue centrada aplicando el método de mean-centring antes de aplicar el algoritmo PCA.

En la figura 4.11(a) se presenta el resultado PCA obtenido, que infiere que hay excelente discriminación entre fumadores, no fumadores y aire ambiente. En el modelo PCA, el primer componente principal que capturó el 79,78% de la varianza en los datos

y arrojó una clara diferencia entre la muestra de aire y las muestras de aliento, mientras el segundo componente principal capturó el 14% de la varianza en los datos y proporcionó la información necesaria para discriminar entre los voluntarios fumadores y no fumadores. La gráfica de los loadings, presentada en la figura 4.11(b), confirmó que la contribución de todos los sensores fue importante en los resultados obtenidos, ya que los parámetros extraídos de las respuestas de todos los sensores aparecen en zonas distintas de la gráfica y lejos del punto que indica el origen de la misma.

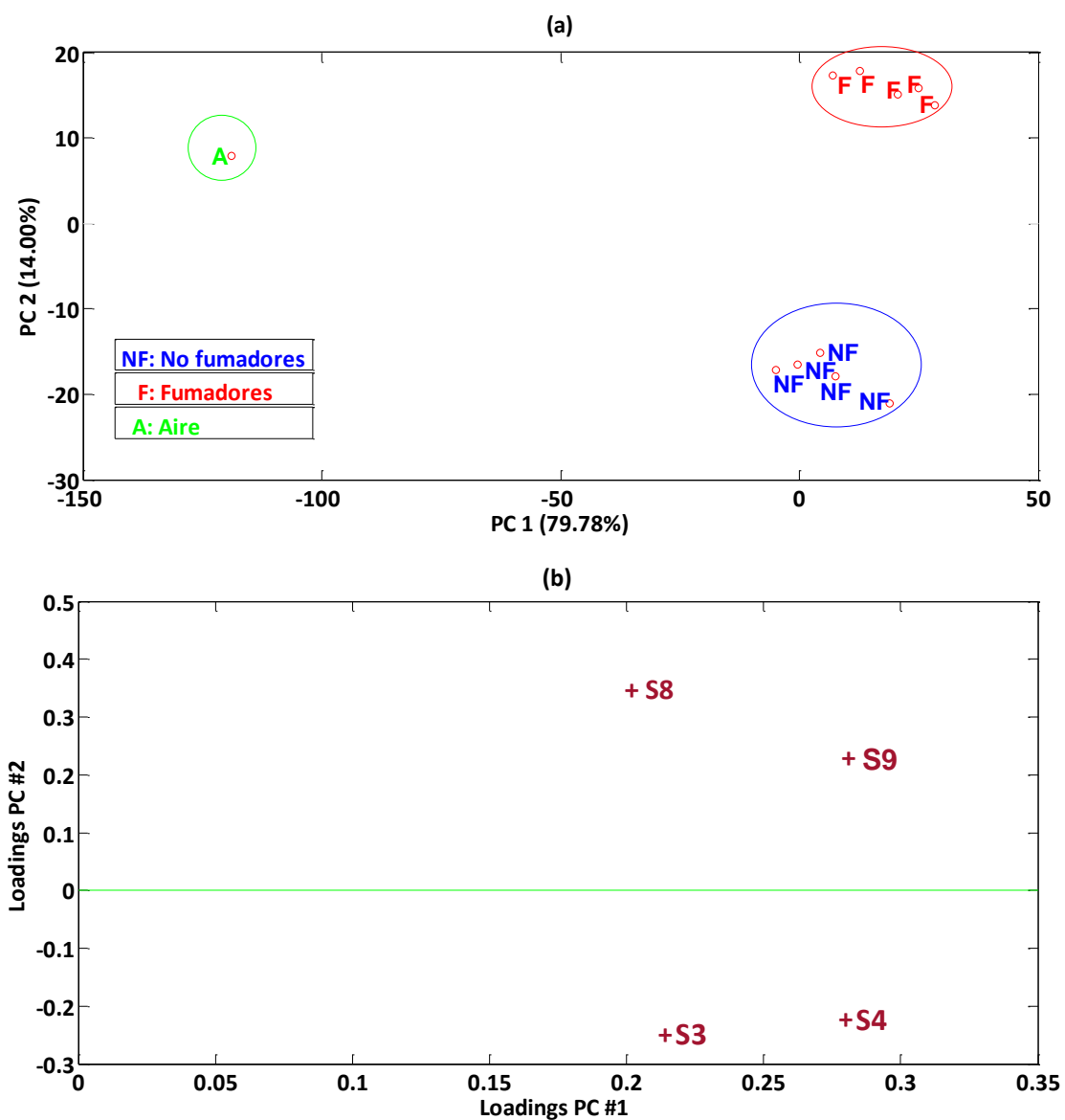


Figura 4.11 (a) Gráfica PCA, mostrando la excelente discriminación entre las muestras de aliento exhalado de sujetos fumadores (F), sujetos no fumadores (NF), y aire ambiente (A). (b) Loadings del modelo PCA

---

## 4.5 CONCLUSIONES

Se fabricaron sustratos para sensores sobre una oblea de silicio, definiéndose por litografía láser dos electrodos de oro paralelos, con una separación de 15  $\mu\text{m}$  en la zona activa donde se deposita el material sensible. Para la elaboración de los nanomateriales de detección de los sensores se utilizó la técnica innovadora de deposición en fase de gas avanzada (AGD), con la cual se logró la fabricación de AuNP de alta pureza, las cuales se depositaron dispersamente en la zona del área activa de los sensores, sin llegar a formar una película continua. La posterior funcionalización de las AuNP con compuestos orgánicos que contienen grupos tiol o aminos enlazó las AuNP de oro, formando una red en forma de monocapa entre los electrodos de los sensores. Dependiendo del compuesto orgánico utilizado, se obtuvieron diferencias significativas en términos de morfología de las nanoestructuras formadas y cubrimiento de la superficie del sensor. La resistencia de los distintos sensores fabricados tuvo valores en el rango de los  $\text{k}\Omega$  o  $\text{M}\Omega$ , que son ideales para sensores químicos de gases. En este tipo de nanomateriales, la conducción eléctrica a través del nanomaterial es proporcionada por el mecanismo de efecto túnel de los electrones que atraviesan la red que forman las nanopartículas y el compuesto orgánico.

Para la realización de medidas experimentales con los sensores, se utilizó el modo dinámico de operación, aplicando sucesivamente a cada sensor pulsos cortos de voltaje, para incrementar la información proporcionada por ellos, y se optimizaron los parámetros de trabajo para efectuar las medidas experimentales. El modo dinámico de operación hizo que la corriente a través de los sensores variara durante cada ciclo de operación entre dos valores, sin llegar a un valor estable, y además se evidenció una muy buena repetitividad del comportamiento de los sensores durante varios ciclos de operación. En la respuesta de los sensores a las muestras de aliento, el compuesto

orgánico proporciona sitios de adsorción para los COV del aliento, y la conductancia del nanomaterial sensible se modifica al adsorberse los COV del aliento en el compuesto orgánico. El nanomaterial sufre un proceso de encogimiento, lo que acerca las nanopartículas de oro y aumenta la transferencia de electrones entre las nanopartículas.

Las pruebas efectuadas para evaluar la capacidad y el tiempo de conservación de los volátiles del aliento recolectado en el sistema de muestreo Bio-VOC demostraron que las muestras de aliento deben ser analizadas de inmediato después de su recolección para evitar la pérdida de COV, ya que en caso contrario el cambio en la amplitud de la corriente eléctrica del sensor ante la exposición a la muestra es considerablemente más bajo.

En un experimento en el cual se midieron muestras de aliento de fumadores, no fumadores y aire ambiente, cuatro de los sensores mostraron respuestas características significativas para cada grupo de estudio. Los materiales sensibles de los sensores que presentaron mayores diferencias entre los sujetos fumadores y no fumadores están formados por AuNP funcionalizadas con decanotiol (2 sensores), butanotiol (1 sensor) y octadecilamina (1 sensor), con afinidad hacia los hidrocarburos no polares y alifáticos, que se encuentran presentes en el humo de los cigarrillos. Las respuestas de todos los sensores a la muestra de aire fueron considerablemente más bajas en amplitud que las respuestas a las muestras de aliento. El modelo de clasificación PCA construido con las respuestas de estos cuatro sensores reveló un excelente potencial de discriminación entre las diferentes categorías de muestras analizadas, lo que sugiere la idoneidad de los sensores desarrollados en este estudio para aplicaciones de análisis de la respiración.

Los resultados obtenidos en este capítulo se emplean en el capítulo 5 de la tesis, para investigar la posibilidad de diagnosticar cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado con el sistema de olfato electrónico.





## CAPÍTULO 5

---

### DIAGNÓSTICO DE CÁNCER GÁSTRICO MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL ALIENTO EXHALADO



## 5.1 PACIENTES Y TOMA DE MUESTRAS

En el estudio se incluyeron pacientes mayores de edad, atendidos por enfermedades gástricas en el Hospital Universitario la Samaritana de la dependencia de Gastrosur S.A.S en Bogotá, Colombia. Fueron seleccionados un total de 30 voluntarios (tabla 5.1): 14 pacientes con cuadro clínico de cáncer gástrico, 15 controles (grupo formado por pacientes diagnosticados con otras enfermedades gástricas) y 1 paciente que se consideró como indefinido en este estudio (siendo éste un paciente con cáncer gástrico que respondió bien a la quimioterapia).

En línea con lo explicado en el capítulo 1 de esta tesis doctoral en relación con la lenta progresión de la enfermedad de cáncer gástrico y la dificultad de diagnosticarla en una fase temprana, los rangos de edades de los pacientes con cáncer gástrico participantes en este estudio oscilaron entre los 46 y los 85 años, y no se identificaron pacientes con una edad menor. Para un adecuado apareamiento entre los sujetos del grupo de pacientes con cáncer gástrico y el grupo de pacientes con otras enfermedades gástricas, en este último grupo se seleccionaron voluntarios con edades comprendidas entre los 49 y 88 años. Además se intentó, en la medida de lo posible, un apareamiento entre los dos grupos de pacientes por sexo (masculino / femenino) y zona de vida (rural / urbana), ya que estas características representan factores de confusión externos y podrían influir en los resultados. El paciente con cáncer gástrico que respondió bien a la quimioterapia, de 75 años de edad, se incluyó dentro de este estudio con el fin de evaluar su clasificación al analizarse el aliento exhalado.

Tabla 5.1 Información acerca de los pacientes

Paciente	Diagnóstico médico <sup>a</sup>	Edad	Sexo <sup>b</sup>	Zona de vida <sup>c</sup>	Medicación	Fumador	Clasificación histológica	Ubicación lesión	Test de <i>H. Pylori</i> <sup>d</sup>	Estudio	
										Cromatográfico	Sensores
G01	CG	71	F	R	Tramadol Ranitidina Hioscina Metoclopramida Omeprazol Dipirona Hidromorfona	No	Intestinal	Cuerpo y antro	N	X	X
G03	CG	79	F	R	Ranitidina Hioscina Metoclopramida Omeprazol Captopril Mofina	No	Difuso	Cuerpo y antro	N	X	X
G04	CG	63	M	R	Omeprazol	No	Intestinal	Antro	N	X	X
G06	CG	66	F	U	Sin información	No	Intestinal	Antro	N	X	–
G07	CG	77	M	R	Acetaminofén Tramadol Omeprazol	No	Intestinal	Cardias	N	X	X
G08	CG	76	M	R	Sodio Acetaminofén Omeprazol	No	Intestinal	Cardias y cuerpo	N	X	X
G09	CG	85	M	U	Omeprazol	No	Intestinal	Cardias y cuerpo	N	X	X
G10	CG	79	M	U	Tramadol Omeprazol Metoclopramida Morfina	No	Intestinal	Cardias	N	X	X
G11	CG	66	F	R	Metoclopramida Ranitidina Hioscina Potasio	No	Intestinal	Antro	N	X	X
G12	CG	61	M	R	Ranitidina Metoclopramida Bromuro de ipratropio Hioscina	Sí	Difuso	Antro	N	X	X
G13	CG	46	M	R	Hidromorfona Hioscina	Sí	Intestinal	Antro	N	X	X
G14	CG	76	M	U	Sin información	No	Difuso	Antro	N	X	X
G15	CG	80	M	R	Furosemda Carvedilol	Sí	Intestinal	Cuerpo	N	X	–

Capítulo 5 | Diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado

					Atorvastatina Bromuro de ipratropio Espironolactona Enalapril Omeprazol						
<b>G17</b>	CG	80	M	U	Omeprazol	Sí	Intestinal	Antro	N	X	–
<b>C01</b>	Gastritis	54	F	R	Sin información	No	Gastritis no atrófica	Antro	P	X	X
<b>C02</b>	Gastritis	70	M	R	Omeprazol	Sí	Gastritis atrófica	Cuerpo y antro	N	X	X
<b>C03</b>	Gastritis	88	M	R	Naproxeno	Sí	Gastritis no atrófica	Sin información	N	X	X
<b>C04</b>	Gastritis	69	M	U	Tramadol Alopurinol Calcitriol Furosemida Levotiroxina Losartán Omeprazol Propranolol Clonazepam	Sí	Gastritis no atrófica	Antro	N	X	X
<b>C05</b>	Gastritis	60	F	U	Losartán Omeprazol Hidroclorotiazida Hidróxido de aluminio	No	Gastritis no atrófica	Antro	N	X	X
<b>C06</b>	Gastritis	56	F	U	Levotiroxina Losartán Metformina	No	Gastritis atrófica	Antro	P	X	X
<b>C07</b>	Gastritis / Úlcera	74	F	U	Omeprazol Nifedipina Lovastatina Losartán Levotiroxina Hidroclorotiazida	No	Gastritis no atrófica	Antro	N	X	X
<b>C08</b>	Gastritis	62	M	R	Omeprazol Captopril	Sí	Gastritis atrófica	Antro	P	X	X
<b>C09</b>	Gastritis	58	F	U	Ranitidina Losartán Hioscina	No	Gastritis atrófica	Cuerpo y antro	P	X	X
<b>C10</b>	Gastritis	77	F	U	Omeprazol Hidróxido de aluminio	No	Gastritis no atrófica	Antro	N	X	X
<b>C13</b>	Gastritis	71	F	R	Losartán Omeprazol Loratadina	No	Gastritis no atrófica	Antro	P	X	X
<b>C14</b>	Gastritis	58	F	U	Levotiroxina Atorvastatina	No	Gastritis no atrófica	Antro	P	X	X

**Capítulo 5 |** Diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado

					Omeprazol Aspirina						
<b>C15</b>	Gastritis	86	M	R	Omeprazol Magnesio Calcio	No	Gastritis atrófica	Cuerpo y antro	N	X	X
<b>C16</b>	Gastritis	87	M	R	Sin información	Sí	Gastritis atrófica	Cuerpo y antro	N	X	X
<b>C17</b>	Gastritis	49	M	R	Trimebutina	No	Gastritis no atrófica	Antro	N	X	X
<b>I01</b>	Recuperación satisfactoria después del tratamiento quimioterapéutico	75	M	U	Sin información	No	Gastritis atrófica	Cuerpo y antro	N	X	X

*Nota:* <sup>a</sup>CG: cáncer gástrico; <sup>b</sup>M: masculino, F: femenino; <sup>c</sup>R: rural, U: urbana; <sup>d</sup>N: negativo, P: positivo

Los pacientes fueron informados con antelación acerca del objetivo de la investigación y los procedimientos a seguir, y firmaron voluntariamente el *consentimiento informado* antes de ser incluidos en el estudio. Cada paciente proporcionó varias muestras de aliento para el estudio. Los voluntarios no consumieron ningún tipo de alimento, bebida o tabaco al menos durante 10 horas antes de la recolección de las muestras de aliento, que se efectuó a primera hora de la mañana, en el intervalo horario de 6 am a 8 am, con los pacientes en ayunas. Se realizaron además pruebas de endoscopia a cada paciente en el mismo día de recolección de muestras, antes del muestreo de aliento, mientras que las pruebas de biopsia se realizaron adicionalmente cuando fue necesario. Estas pruebas médicas llevaron a la confirmación final de la enfermedad de cada paciente. En todos los casos, el adenocarcinoma se confirmó mediante pruebas patológicas.

Para la recolección de las muestras de aliento, se utilizó el dispositivo Bio-VOC presentado en el capítulo 2 de esta tesis doctoral. Durante el muestreo de la respiración, el paciente exhaló normalmente en el dispositivo de muestreo a través de una boquilla

desechable, hasta vaciar totalmente los pulmones (figura 5.1). La primera parte de la respiración, que contiene los compuestos exógenos inhalados por el paciente, salió a través del extremo abierto sin retorno del dispositivo de muestreo, y el Bio-VOC sólo retuvo la última parte de la respiración (129 ml de volumen), que corresponde al aire alveolar. Antes de cualquier uso, cada dispositivo de muestreo (Bio-VOC) se desensambló en sus partes constituyentes, y éstas se introdujeron durante 15 minutos en una solución de 20 ml de desinfectante (Amukina, España) disuelto en 1 litro de agua destilada, y luego se secaron naturalmente sin limpiar. Este proceso aseguró la limpieza del dispositivo de muestreo, evitando al mismo tiempo la contaminación de cada muestra nueva con muestras de otros pacientes recolectadas anteriormente.



Figura 5.1 Exhalación en el dispositivo de muestreo de aliento Bio-VOC

Unas de las muestras de aliento se midieron justo inmediatamente después de su recolección con el sistema de sensores de gases, al ser éste portable y poder ser llevado

a las instalaciones del hospital, mientras otras fueron almacenadas en tubos preconcentradores de volátiles y fueron medidas ulteriormente con el sistema de cromatografía de gases, al no disponerse de un equipo de cromatografía de gases en el hospital. Para el almacenamiento de las muestras para su ulterior análisis cromatográfico, éstas se transfirieron a tubos de vidrio que contienen material adsorbente Tenax TA (ORBO™ 420, Sigma-Aldrich, Colombia). Para aumentar la concentración de los COV atrapados por el material adsorbente, se transfirieron dos muestras de aliento del mismo paciente al mismo tubo de almacenamiento. Los tubos adsorbentes se almacenaron a 4°C en un refrigerador para muestras biológicas antes de efectuar el análisis cromatográfico, que se realizó seis meses después de la recolección de muestras. La relación de los pacientes cuyas muestras se midieron con cada uno de los dos sistemas de medición (cromatografía de gases o sensores de gases) se indica en la tabla 5.1 de los pacientes.

---

## **5.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

El análisis cromatográfico de las muestras se llevó a cabo empleando un sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo (GC-QTOF-MS, por su abreviación en inglés, modelo Agilent G7200AA), que representa el estado del arte en cromatografía de gases no dirigida. Para este estudio se utilizó una muestra de aliento proporcionada por cada paciente.

Para medir las muestras, se calentó el material adsorbente donde se habían almacenado las muestras, para la desorción térmica de los COV del aliento retenidos por el material adsorbente. Para ello, se cortó el tubo preconcentrador de volátiles, y el material Tenax fue transferido a un vial de vidrio de 20 ml de volumen, previsto con un tapón con septum, cerrado herméticamente. El vial se introdujo durante 20 minutos en un baño de aceite encima de una placa calefactora, calentada a una temperatura de 100°C. Esto permitió la desorción térmica de los compuestos volátiles de la muestra de

aliento atrapados en el material adsorbente, que formaron un espacio de cabeza encima del material adsorbente, dentro del vial de vidrio.

A continuación, se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida, con fibra de DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano), para capturar los COV del espacio de cabeza formado dentro del vial de vidrio, y luego inyectarlos en el puerto de inyección del GC-QTOF-MS para el análisis cromatográfico. La fibra de SPME se introdujo en el espacio de cabeza formado dentro del vial punzando a través del septum del tapón del vial, donde se dejó durante 30 minutos.

El GC-QTOF-MS fue operado en modo “splitless” (que permite vaporizar y transferir la mayor parte de la muestra a la columna cromatográfica), y se utilizó una columna cromatográfica HP-5MSI (Agilent Technologies). Las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes: tiempo de desorción: 2 minutos; temperatura de desorción: 250°C. Los parámetros del horno fueron los siguientes: 10 minutos a la temperatura inicial de 50°C; rampa de 10°C/minuto hasta llegar a 155°C; rampa de 20°C/minuto hasta llegar a 270°C; 10 minutos a 270°C. La ionización se llevó a cabo por medio de impacto electrónico, con una energía de los electrones de 70 eV y una temperatura de 230°C.

Los cromatogramas se adquirieron para compuestos con masa/carga que van desde 35 hasta 275, a una tasa de muestreo de 5 espectros/segundo. La figura 5.2 muestra los cromatogramas adquiridos para diez pacientes con cáncer gástrico y cuatro pacientes del grupo de control, pudiéndose ver ciertas diferencias entre los dos grupos. La deconvolución de los cromatogramas se realizó utilizando el software Agilent MassHunter Unknown Analysis, ejecutado en modo automático, con el factor de similitud mínimo fijado en 80.

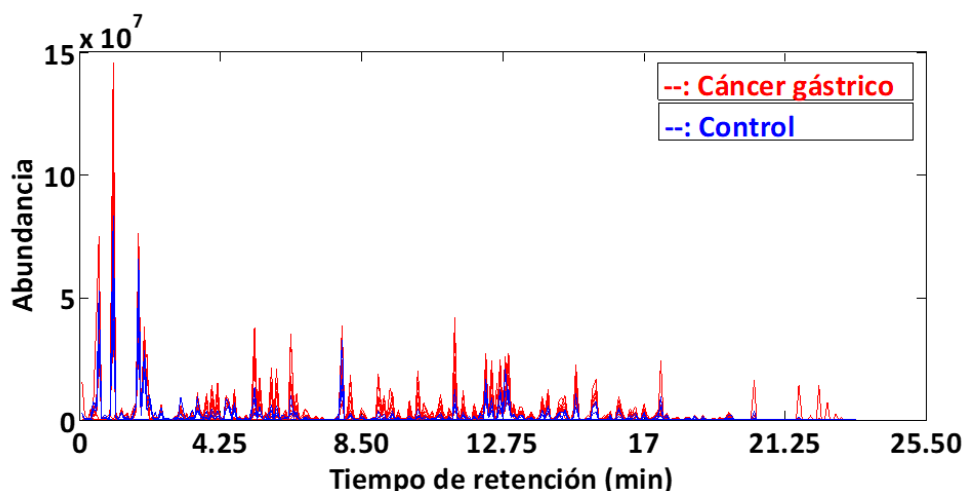


Figura 5.2 Cromatogramas adquiridos de 10 pacientes con cáncer gástrico y 4 pacientes del grupo de control.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a la librería de espectros de masas NIST14. En total se encontraron hasta 650 COV en el aliento de los voluntarios. Los más abundantes, donde la abundancia de cada COV viene dada por el área bajo el pico cromatográfico, se presentan en la tabla 5.2. Estos compuestos pertenecen a los grupos de compuestos químicos de los alquenos, alcanos, alquilos, compuestos aromáticos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y ácidos.

Tabla 5.2 Los COV más abundantes encontrados en el aliento de los pacientes

No.	Compuesto	Relación masa/carga (m/z)	Tiempo de retención (min)
1	Tolueno	92.0650	1.9343
2	1,3-Dimetilbenceno	91.0576	2.8396
3	Estireno	78.0491	3.0782
4	4,5-Dimetilnonano	57.0723	5.2319
5	Hexadecano	85.1037	8.3898
6	Triclorometano	85.1037	1.2379
7	(E)-3-Eicoseno	69.0721	8.7487
8	(Z)-3-Hexadeceno	69.0721	8.8650
9	2-Butil-1-octanol	57.0723	8.9749
10	Cis-1,1,3,4-tetrametilciclopentano	69.0721	5.5452
11	Cis-1,4-dimetilciclooctano	69.0721	5.6049
12	2,4-Dimetildecano	57.0723	5.3111
13	4,6-Dimetildodecano	57.0723	7.8907
14	2,6-Dimetilnonano	57.0723	4.6062
15	Alcohol bencílico	108.0601	4.9184
16	2,2,4,4,6,8,8-Heptametilnonano	57.0723	9.0469
17	4,7-Dimetilundecano	57.0723	5.9463
18	5-Metil-2-(1-metiletil)-1-hexanol	57.0723	8.5037

**Capítulo 5 |** Diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado

19	(S)-(+)-5-Metil-1-heptanol	57.0723	4.8112
20	Éster eicosilvinílico del ácido carbónico	57.0723	9.6588
21	(E)-3-Octadeceno	69.0721	10.2267
22	D-limoneno	93.0717	4.8523
23	Éster butílico del ácido propiónico	73.0313	3.0946
24	Deciloctil éter	85.1037	9.1359
25	2,2-Dimetilhexanal	72.0904	1.1785
26	Éster tridecilpentílico del ácido sulfuroso	57.0723	10.6132
27	(1-Metiletil)benceno	120.0971	3.9394
28	6-Metiltridecano	57.0723	9.8464
29	Éster octilvinílico del ácido carbónico	43.0561	5.2645
30	Ácido pentanóico	60.0226	4.2760
31	Etilbenceno	91.0576	2.7586
32	2,4-Dietil-1-heptanol	69.0721	10.9604
33	2,3,5,8-Tetrametildecano	85.1037	10.6757
34	Éster butílico del ácido propanóico	75.0276	3.2334
35	4-Metiloctano	56.0635	2.7445
36	1-Iodo-tetradecano	85.1037	11.1645
37	3,3-Dimetilhexano	57.0723	6.0652
38	4-Metil-1-undeceno	85.1037	5.7675
39	Ácido butoxiacético	57.0723	2.9497
40	Éster pentílico del ácido acético	61.0126	1.2174
41	Alfa-metilestireno	117.0725	4.2128
42	3,3,5-Trimetildecano	57.0723	7.9914
43	2,5,6-Trimetildecano	57.0723	4.4157
44	5-Metildodecano	126.1419	9.7921
45	Éster dodecilhexílico del ácido sulfuroso	85.1037	9.2894
46	1-Octen-3-ol	72.0904	2.1513
47	2-Isopropil-5-metil-1-heptanol	84.0951	10.7524
48	Éster nonilvinílico del ácido carbónico	57.0723	6.7449
49	2,4,6-Trimetiloctano	57.0723	4.1015
50	1-Undecanol	161.1354	10.8531
51	1,11-Dodecadieno	67.0555	5.8987
52	2-Etil-1-decanol	57.0723	6.5501
53	2,3,6-Trimetilheptano	57.0723	3.9042
54	1-Iodo-dodecano	85.1037	10.8425
55	2,7-Dimetil-1,7-octadieno	56.0635	4.4620
56	2,2,3,4-Tetrametilpentano	57.0723	3.1385
57	Éster dodecilpentílico del ácido sulfuroso	85.1037	8.9351
58	Éster 6-etiloct-3-il isohexílico del ácido oxálico	85.1037	9.9978
59	Heptacosano	57.0723	11.6067
60	2-(1,1-Dimetiletil)ciclohexanol	82.0787	8.6192
61	(E)-4-Etil-2-octeno	69.0721	9.0865
62	Éster isohexil 2-pentílico del ácido sulfuroso	85.1037	6.9426
63	6-Etil-2-metiloctano	119.0884	5.1329
64	Derivado de 3,4-dihidroxifenilglicol	355.0818	12.6697
65	(Z)-2,3-Dimetil-3-hepteno	56.0635	11.1530
66	2,3,5-Trimetilhexano	85.1037	2.3394
67	2,3,8-Trimetildecano	85.1037	8.8201

## Capítulo 5 | Diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado

68	Éster 2,2-dimetilpentílico del ácido propanóico	59.0504	4.4553
69	Propilbenceno	91.0576	3.8414
70	1-Etil-2-heptilciclopropano	56.0635	4.9033

Para hallar los posibles biomarcadores del cáncer gástrico, dado el tamaño reducido de número de muestras disponibles, se utilizó el test estadístico t de Student, con el valor de corte  $\alpha = 0,05$ , correspondiente al nivel de confianza de 95%. Este análisis se efectuó sobre 275 compuestos, que fueron encontrados en el aliento de más de 70% de los pacientes de cada grupo de estudio. La edad de los pacientes (mayores o menores de 60 años), el sexo, la zona de vida, el hábito tabáquico y la presencia o ausencia de la infección con la bacteria helicobacter pylori, se utilizaron como factores de confusión para eliminar de la lista inicial de posibles biomarcadores aquellos COV que podrían verse afectados por factores externos no necesariamente relacionados con la enfermedad.

En el análisis estadístico inicial donde se compararon las abundancias de todos los 275 compuestos en el aliento de los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes con otras enfermedades gástricas, se encontraron ocho compuestos con abundancias estadísticamente diferentes entre los dos grupos de pacientes analizados; éstos se caracterizan por los siguientes valores de relación masa/carga y tiempo de retención: [79.0553@1.7808]; [69.0716@7.6237]; [71.0878@10.8352]; [91.0576@2.8311]; [43.0559@8.1518]; [153.1655@5.3618]; [324.9925@9.0235]; [215.1779@13.2262].

A estos posibles biomarcadores de cáncer gástrico identificados inicialmente se les aplicó un análisis estadístico adicional, en el cual todos los pacientes del estudio, independientemente de su enfermedad, fueron distribuidos sucesivamente por edad (mayores o menores de 60 años), sexo, zona de vida, hábito tabáquico y presencia o ausencia de la infección con la bacteria helicobacter pylori, para averiguar si eran clasificados estadísticamente diferentes por alguno de estos factores de confusión. Este análisis estadístico produjo los siguientes resultados:

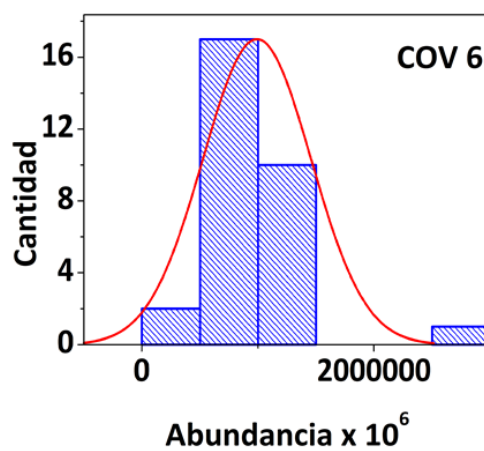
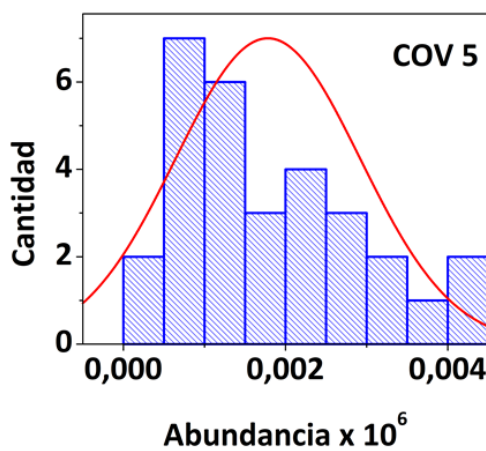
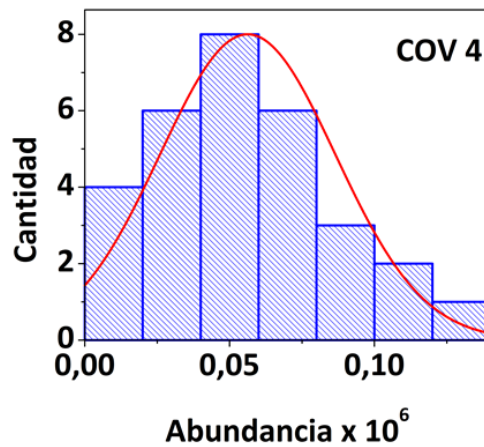
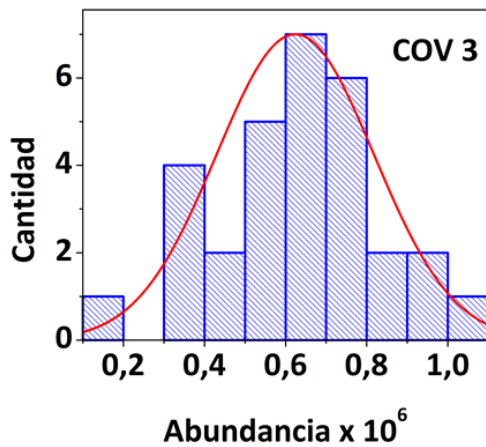
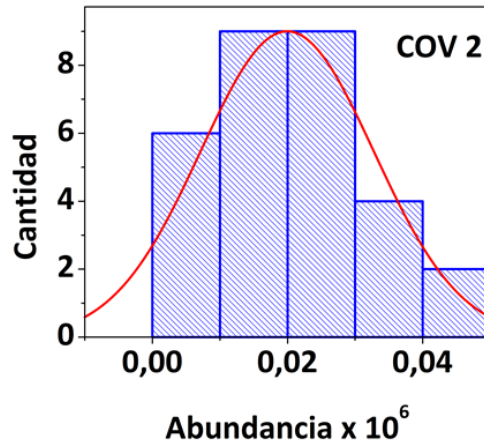
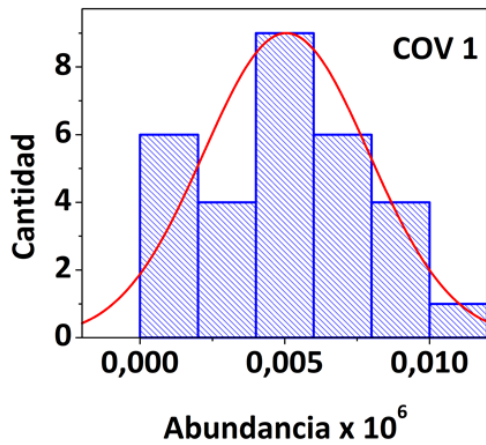
- El análisis estadístico por edad no identificó ningún compuesto estadísticamente diferente;
- El análisis estadístico por sexo identificó ser estadísticamente diferente al compuesto caracterizado por la relación masa/carga y tiempo de retención [79.0553@1.7808], el cual fue descartado de la lista inicial de biomarcadores;
- El análisis estadístico por zona de vida no identificó ningún compuesto estadísticamente diferente;
- El análisis por el hábito tabáquico no identificó ningún compuesto estadísticamente diferente;
- El análisis por la infección con la bacteria helicobacter pylori no identificó ningún compuesto estadísticamente diferente.

Tras este estudio, se seleccionaron los siguientes compuestos como posibles biomarcadores del cáncer gástrico, definidos por las relaciones masa/carga y tiempos de retención marcados entre corchetes:

- COV1: [69.0716@7.6237];
- COV2: [71.0878@10.8352];
- COV3: [91.0576@2.8311];
- COV4: [43.0559@8.1518];
- COV5: [153.1655@5.3618];
- COV6: [324.9925@9.0235];
- COV7: [215.1779@13.2262]

A continuación se hizo un estudio para comprobar si la abundancia de todos estos compuestos en el aliento de los pacientes analizados tenía una distribución normal, para justificarse la utilización del test estadístico t de Student. Solo seis de los compuestos (COV1 a COV6) tuvieron una distribución normal, tal como se puede ver en la figura 5.3. Para el compuesto COV7, que no tuvo una distribución normal, se aplicó el test de Mann-Whitney para muestras independientes, utilizando el valor de significación  $\alpha = 0,05$ , y

se encontró que este compuesto no es estadísticamente diferente entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes con otras enfermedades gástricas, por lo cual se descartó como posible biomarcador de cáncer gástrico.



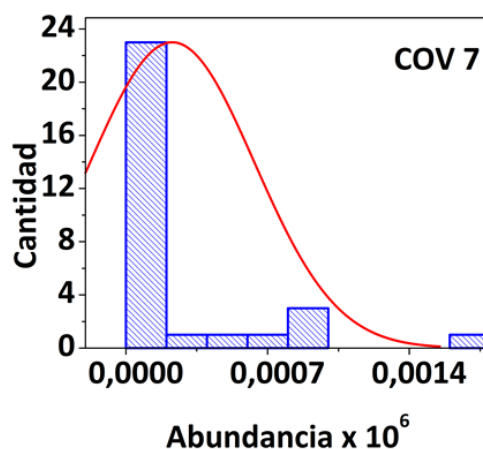



Figura 5.3 Abundancia de los compuestos COV1 a COV7

Tras estos análisis, se procedió con la identificación de los compuestos químicos COV1 a COV6 con la ayuda de la librería de espectros de masas NIST14. Uno de los compuestos (COV6) fue identificado como dodecametilciclohexasiloxano, y también fue descartado porque proviene de la fibra de SMPE utilizada para capturar e inyectar los COV de las muestras en el GC-QTOF-MS. Los compuestos orgánicos volátiles que se proponen finalmente en este estudio como posibles biomarcadores de cáncer gástrico en el aliento exhalado se presentan en la tabla 5.3.

Tabla 5.3 Biomarcadores de cáncer gástrico encontrados en este estudio.

Compuesto		Tiempo de retención (min)	Fórmula estructural	Nivel de probabilidad (p)
COV1	Trans-2,2-dimetil-3-deceno	7.6237		0.006
COV2	Octadecano	10.8352		0.022
COV3	M-xileno	2.8311		0.029
COV4	Hexadecano	8.1518		0.031

COV5	1-Ciclohexil-2-(ciclohexilmetil)pentano	5.3618		0.034
------	---	--------	--	-------

En la figura 5.4 se observa representada la abundancia obtenida para cada uno de los biomarcadores mencionados en la tabla 5.3, tanto para el grupo de control como para el grupo de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico. Para los primeros cuatro biomarcadores se observa un incremento de la abundancia en el grupo de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico en comparación con el grupo de control, mientras para el último la abundancia fue mayor en el grupo de control.

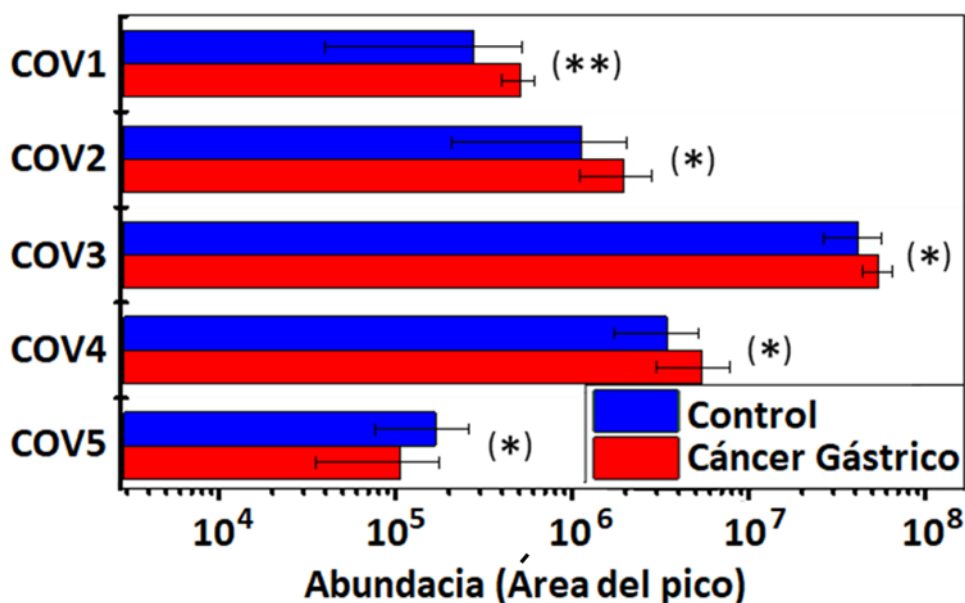


Figura 5.4 Abundancia de los biomarcadores en el aliento de los pacientes con cáncer gástrico y del grupo de control. La barra de errores representa el error estándar de la media. (\*) Diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) entre el grupo de pacientes con cáncer gástrico y el grupo de control; (\*\*) Diferencia estadística significativa ( $p < 0,01$ ) entre el grupo de pacientes con cáncer gástrico y el grupo de control.

Los rangos de la abundancia de cada biomarcador en el aliento de todos los pacientes que participaron en este estudio se detalla en la figura 5.5. Los diagramas de caja de la figura 5.5 presentan los valores de la mediana de los biomarcadores en cada grupo de

pacientes, y los intervalos de confianza de 95% para la mediana, que vienen dados por los rectángulos.

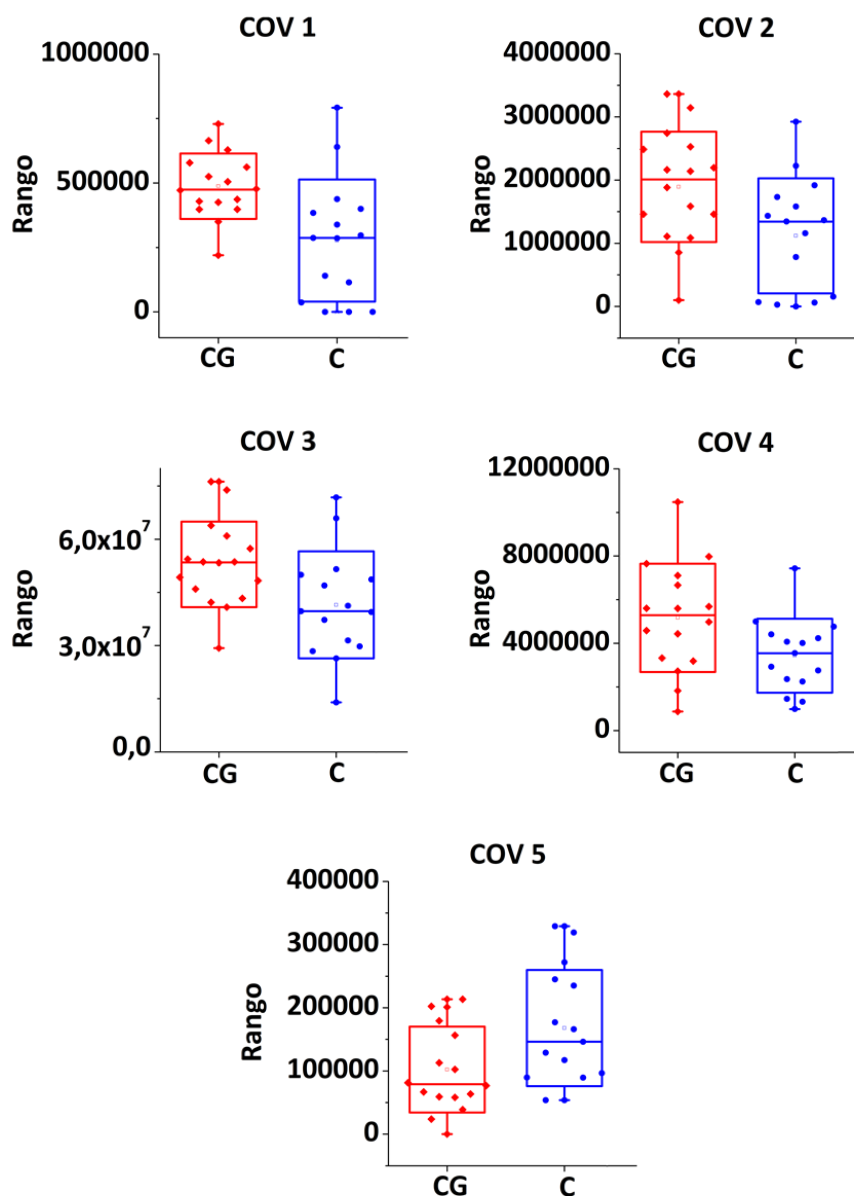


Figura 5.5 Diagramas de caja de la abundancia de los biomarcadores en el aliento de cada uno de los pacientes.  
CG: cáncer gástrico; C: control.

Los compuestos identificados en este estudio como posibles biomarcadores de cáncer gástrico en el aliento exhalado pertenecen a los grupos de compuestos químicos de los alquenos (*trans-2,2-dimetil-3-deceno*), compuestos aromáticos (*m-xileno*) y

alcanos (*hexadecano*, *octadecano* y *1-ciclohexil-2-(ciclohexilmetil)pentano*). La patofisiología que pueda explicar estos biomarcadores y su mecanismo bioquímico de generación, no está completamente elucidada actualmente.

Estudios recientes sugirieron que el desarrollo del cáncer conlleva un aumento del estrés oxidativo y la sobreproducción de enzimas citocromo P450 debido al estrés metabólico causado por la carcinogénesis [23, 116, 117]. Como el funcionamiento del organismo humano se basa en la fosforilación oxidativa mitocondrial para producir energía, la pérdida de radicales de oxígeno lleva a la formación de especies de oxígeno altamente reactivo, tales como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxil, que son muy tóxicas a nivel celular. Los radicales reactivos tienden a provocar la peroxidación lipídica y a convertir los ácidos grasos poliinsaturados en varios alcanos volátiles, que son liberados a través de la respiración al poco tiempo de ser producidos [118-120].

Los alcanos alifáticos de cadena lineal tales como *octadecano* (con cadena de 8 átomos de carbono) y *hexadecano* (con cadena de 16 átomos de carbono) son generados por la peroxidación lipídica [118, 120]. Tanto el octadecano como el hexadecano fueron encontrados en el presente estudio en niveles elevados en el aliento de pacientes con cáncer gástrico. A su vez, *trans-2,2-dimetil-3-deceno* podría ser generado como producto intermediario de los dienos conjugados una vez iniciada la reacción en cadena de la peroxidación lipídica [117].

Otro de los biomarcadores encontrados en este estudio, *m-xileno*, es un hidrocarburo aromático de origen exógeno, y su nivel elevado en el aliento de los pacientes con cáncer gástrico podría deberse a factores ocupacionales. M-xileno se encuentra entre los pesticidas utilizados en la agricultura, y además se utiliza comúnmente como solvente, agente de limpieza, diluyente de pintura, en la industria química y en la industria manufacturera de productos plásticos, fibras sintéticas, caucho y productos de cuero.

Los albañiles también son expuestos a m-xileno por contacto con solventes y diluyentes de diferentes tipos de pinturas (laca, barniz) que contienen m-xileno.

Por último, el origen metabólico del *1-ciclohexil-2-(ciclohexilmetil)pentano*, el único biomarcador que se encontró en niveles más bajos en el aliento de los pacientes con cáncer gástrico respecto a los pacientes del grupo de control, es difícil de elucidar con los conocimientos metabolómicos existentes al día de hoy.

En estudios similares efectuados en poblaciones de pacientes con enfermedades gástricas de China (país representativo de la zona del este asiático) y Letonia (país representativo de la zona de los Países Bálticos de Europa), se identificaron como biomarcadores de cáncer gástrico, además de alquenos y compuestos aromáticos que se encontraron también en el presente estudio, cetonas, aldehídos, alcoholes y nitrilos. En esos estudios se hallaron niveles elevados de cetonas (6-metil-5-hepteno-2-uno – tanto en China como en Letonia), aldehídos (nonanal – Letonia), alcoholes (2-butoxietanol – China, y 2-etil-1-hexanol – Letonia), alquenos (isopreno – China), nitrilos (2-propenonitrilo – China), y compuestos aromáticos (furfural – China, y estireno – Letonia) [121, 122]. Las muestras de los pacientes de China y Letonia se analizaron con un mismo equipo de GC-MS, que sin embargo no disponía de un sistema de QTOF como el utilizado en el presente estudio, el cual confiere mayor resolución para la identificación de los compuestos. Tanto en el estudio de China como en el estudio de Letonia participaron 130 pacientes con enfermedades gástricas (37 pacientes con cáncer gástrico, y 32 pacientes con úlcera y 61 pacientes con enfermedades menos severas que formaron el grupo de control).

A pesar de las diferencias en el diseño de los estudios, corroborando los resultados obtenidos en los estudios de China y Letonia con el presente estudio, que fueron realizados en las tres regiones con la mayor incidencia global de cáncer gástrico (Este de Asia, Países Bálticos de Europa y Sudamérica [123-125]), se pueden ver diferencias entre las tres poblaciones de distintas zonas geográficas del planeta, que se deben a factores

asociados con el estilo de vida, alimentación y genética (flora gastrointestinal), los cuales tienen un efecto importante sobre la metabolómica de la enfermedad del cáncer gástrico.

Las abundancias de los biomarcadores encontrados en el presente estudio se utilizaron para la construcción de un modelo de reconocimiento de patrones, para lo cual se aplicó el algoritmo no supervisado PCA. La matriz de datos, formada por la abundancia de cada biomarcador en el aliento de cada voluntario participante en el estudio, fue auto-escalada antes de aplicar el algoritmo PCA. El modelo de clasificación PCA obtenido es presentado en la figura 5.6. Tanto el modelo construido con los dos primeros componentes principales, que capturaron una varianza de 65,06% en los datos (figura 5.6(a)), como el modelo construido con los tres primeros componentes principales, que capturaron una varianza de 80,89% en los datos (figura 5.6(b)), mostraron una muy buena clasificación entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes de control, que se agruparon en dos clústeres distintos. Sólo dos pacientes del grupo de control (C07 y C13) y un paciente con cáncer gástrico (G01) no fueron clasificados correctamente por el modelo PCA, lo que arroja una tasa de acierto de 90%, una sensibilidad de 93% y una especificidad de 87%<sup>1</sup>. Entre los tres pacientes clasificados erróneamente, el paciente C07 fue el único paciente diagnosticado con úlcera, el paciente C13 realizó una exhalación doble debido a su debilidad física, y el paciente G01 se encontraba en un estado de salud muy crítico. El paciente indefinido I01 (paciente con cáncer gástrico que respondió bien a la quimioterapia) fue agrupado por el modelo de clasificación en el grupo de pacientes de control.

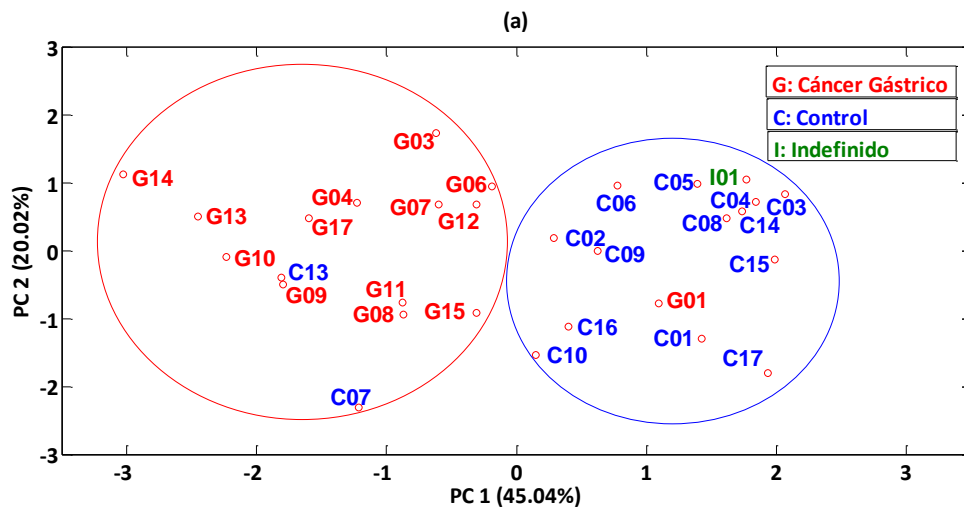
La gráfica de los loadings, presentada en la figura 5.6(c), confirmó que la contribución de todos los biomarcadores fue importante en los resultados obtenidos, ya que todos

---

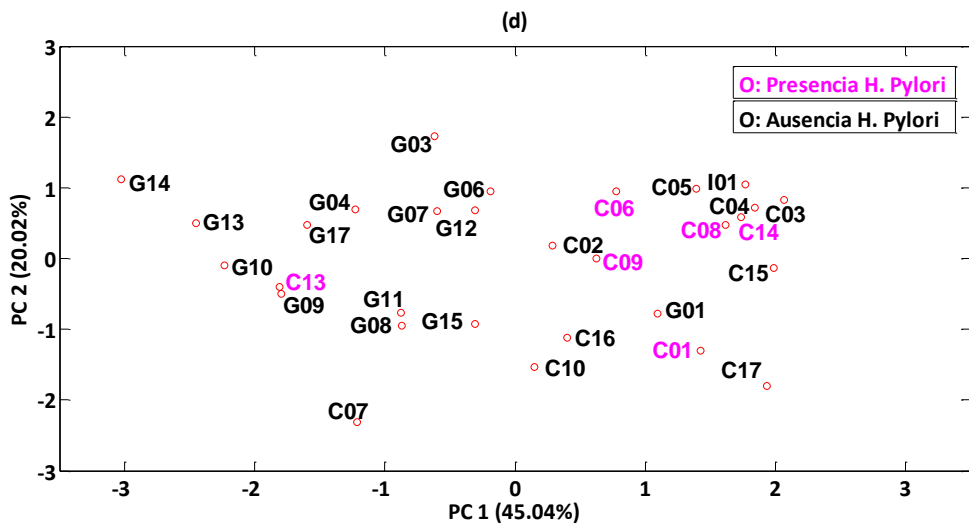
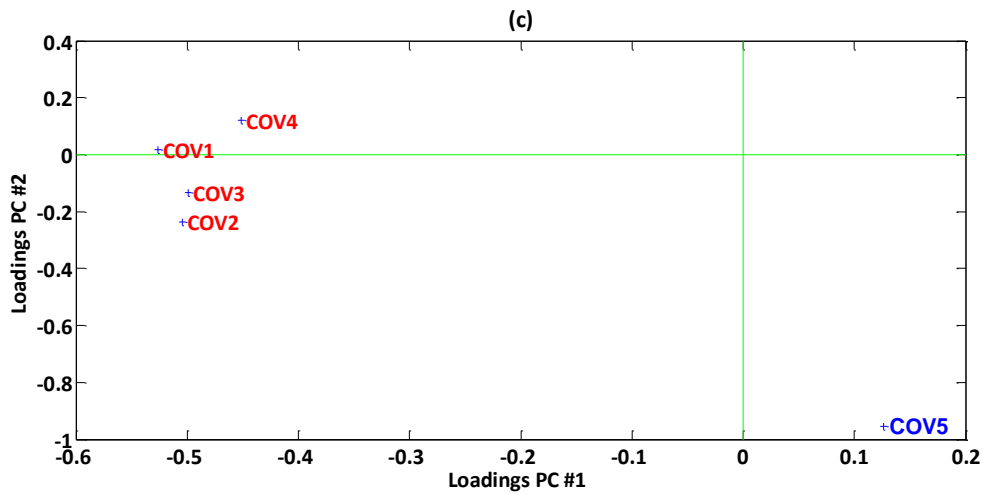
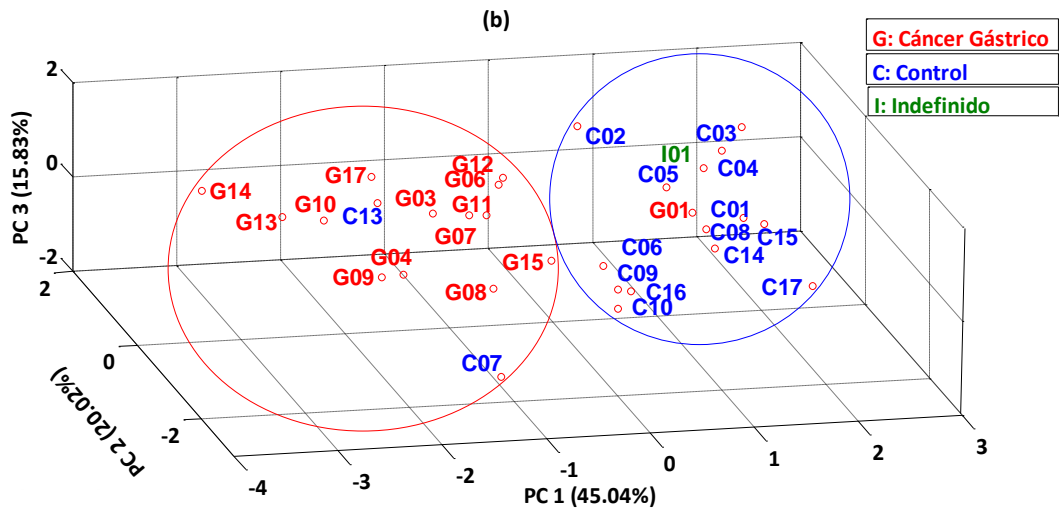
<sup>1</sup> La tasa de acierto del modelo PCA se calculó como el número de muestras agrupadas correctamente sobre el número total de muestras empleadas en el análisis. La sensibilidad se calculó como el número de verdaderos positivos sobre verdaderos positivos más falsos negativos. La especificidad se calculó como el número de verdaderos negativos sobre verdaderos negativos más falsos positivos.

ellos aparecen en zonas distintas de la gráfica y lejos del punto que indica el origen de la misma. Asimismo, se puede ver una diferencia clara en los loadings del primer componente principal entre los biomarcadores encontrados en mayor abundancia y el biomarcador encontrado en menor abundancia en los pacientes con cáncer gástrico, que aparecen en la región negativa y positiva del eje de los loadings del primer componente principal, respectivamente.

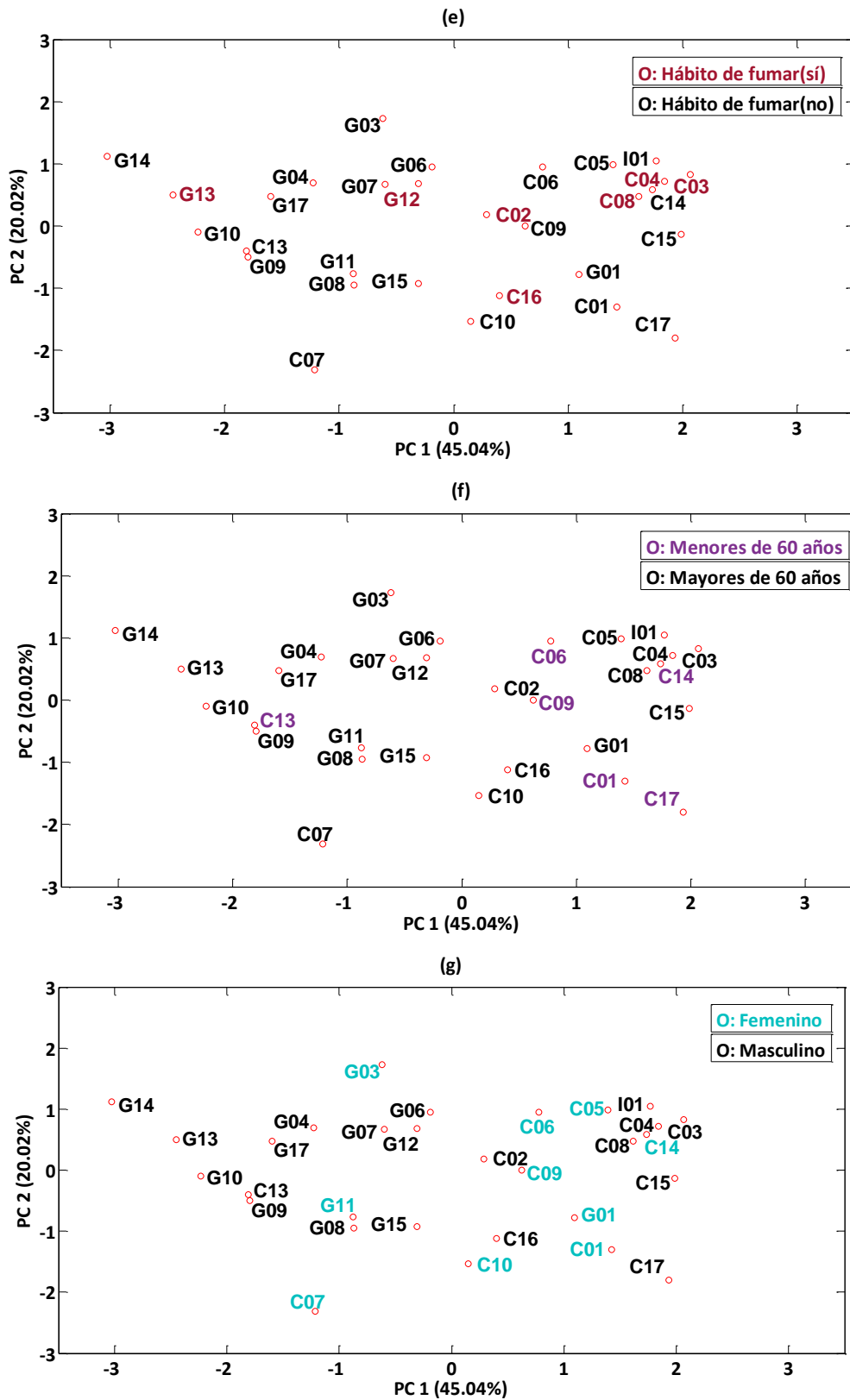
Para comprobar que el modelo de clasificación no fue afectado por posibles factores de confusión, en la gráfica PCA presentada en la figura 5.6(a) se representaron a continuación los pacientes en función de los factores de confusión más comunes presentes en el aliento de los pacientes con cáncer gástrico, tales como la infección por la bacteria helicobacter pylori, el hábito de fumar, la edad, el sexo y la zona de vida. Estas representaciones se muestran en la figura 5.6(d)-(h), y denotan una mezcla total de los pacientes, lo que demuestra que estos factores de confusión no interfirieron en los resultados obtenidos.



Capítulo 5 | Diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado



Capítulo 5 | Diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado



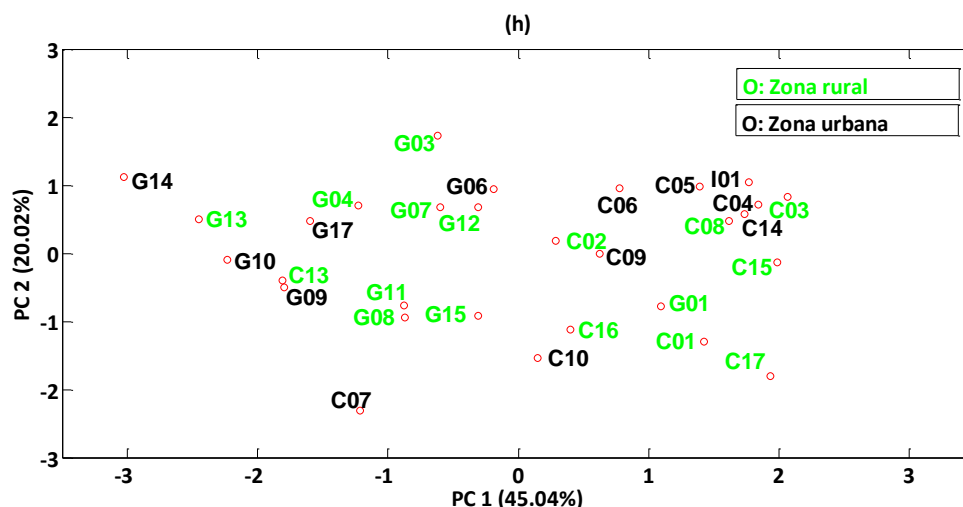


Figura 5.6 Modelo de clasificación PCA construido con las abundancias de los biomarcadores: (a) Representación de los dos primeros componentes principales; (b) Representación de los tres primeros componentes principales. (c) Loadings del modelo PCA. Clasificación por factores de confusión: (d) Infección por H. pylori; (e) Hábito de fumar; (f) Edad; (g) Sexo; (h) Zona de vida.

### 5.3 ANÁLISIS CON EL SISTEMA DE SENSORES DE GASES

Para este análisis se empleó el sistema de olfato electrónico descrito en el capítulo 4 de esta tesis, y se utilizaron dos muestras de aliento proporcionadas por cada paciente del estudio. Las muestras de aliento se inyectaron directamente del Bio-VOC a la cámara de sensores, empujando lentamente el émbolo, durante 10 segundos, a lo largo de todo el recorrido interior del Bio-VOC, para la transferencia total y adecuada de los COV a la cámara de medidas.

Para la medición de cada muestra se emplearon las siguientes etapas: (a) 5 minutos en estado estacionario, con los dos orificios de la cámara de medidas tapados, tal como se muestra en la figura 4.5 del capítulo 4, para la estabilización de los sensores; (b) 10 minutos de exposición a la muestra de aliento, también en estado estacionario, tapando los dos orificios de la cámara de medidas una vez introducida la muestra; (c) 5 minutos

en flujo continuo de aire sintético, a un caudal de 1 L/min, para limpiar la superficie de los sensores y purgar la cámara de medidas.

Durante la realización de las medidas, los sensores fueron alimentados alternativamente, en ciclos sucesivos de 10 segundos cada uno, a un voltaje de 5V, cada medida con duración de 6 ciclos, adquiriendo la corriente a través de cada sensor para su posterior análisis. La figura 5.7 muestra la respuesta típica de un sensor de gases durante la exposición a una muestra de aliento. Por cada ciclo de operación del sensor se extrajo 1 parámetro, correspondiente al valor medio de todos los valores de la corriente adquiridos en ese ciclo, tal como se muestra en la figura 5.7.

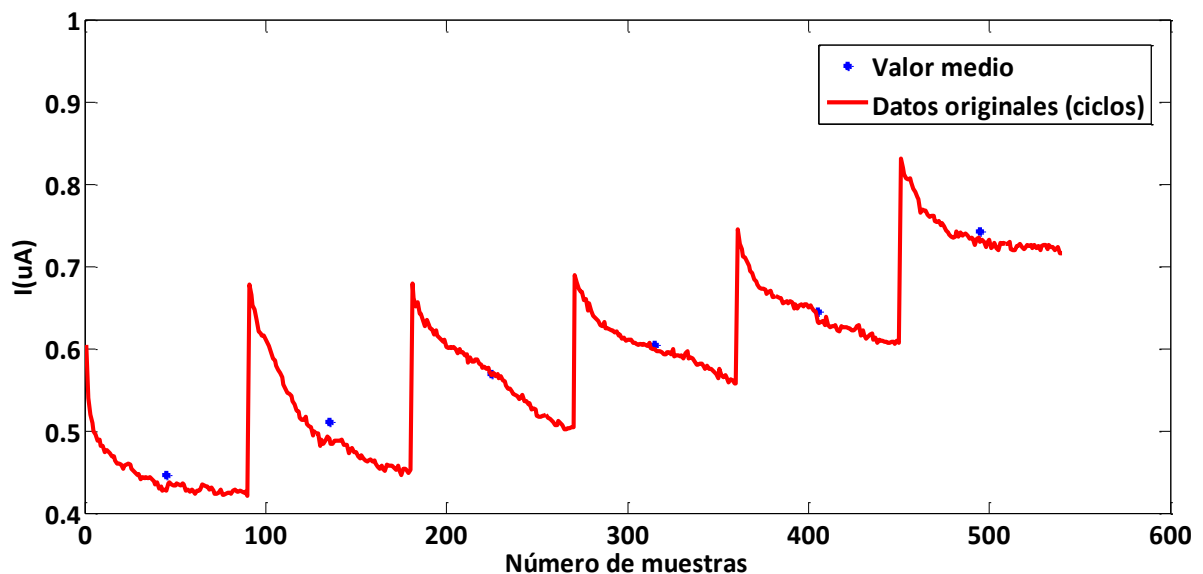


Figura 5.7 Respuesta del sensor S10, basado en nanopátículas de oro funcionalizadas con octadecilamina, a una muestra de aliento exhalado (curva roja), y los parámetros extraídos (puntos azules).

Utilizando los parámetros extraídos de las respuestas de los sensores a todas las muestras analizadas, se construyeron modelos de reconocimiento de patrones para cada sensor por separado, empleando para ello el algoritmo no supervisado PCA. La matriz de datos de cada sensor fue auto-escalada antes de emplear el algoritmo PCA. Cada matriz fue formada por 60 filas (que corresponden a las 2 muestras medidas por

cada paciente) y 6 columnas (que corresponden a los 6 parámetros extraídos de las respuestas de cada sensor).

La figura 5.8(a) muestra el resultado obtenido con la técnica PCA utilizando las respuestas del sensor S10, basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con octadecilamina. Esta figura ilustra, en el primer componente principal del modelo PCA, que capturó el 85,02% de la varianza en los datos, una excelente clasificación de todos los pacientes con cáncer gástrico, mientras que las dos muestras correspondientes al paciente de control (C13), se clasificaron erróneamente en el grupo de pacientes con cáncer gástrico. De este modo, se obtuvo una tasa de acierto de 97%, una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93%, en la clasificación de los pacientes con cáncer gástrico.

Los seis parámetros extraídos de los seis ciclos de operación del sensor tuvieron relevancia en los resultados obtenidos, tal como lo demuestra la gráfica de los loadings presentada en la figura 5.8(b), donde se observa que los seis parámetros utilizados para construir el modelo PCA aparecen en zonas distintas de la gráfica y lejos del punto que indica el origen de la misma. Cabe resaltar que el paciente indefinido I01 (paciente con cáncer gástrico que respondió bien a la quimioterapia) fue agrupado en el grupo de pacientes de control tanto por el modelo PCA basado en las respuestas del sensor como por el modelo de clasificación construido con los biomarcadores de cáncer gástrico encontrados en este estudio (figura 5.6(c)).

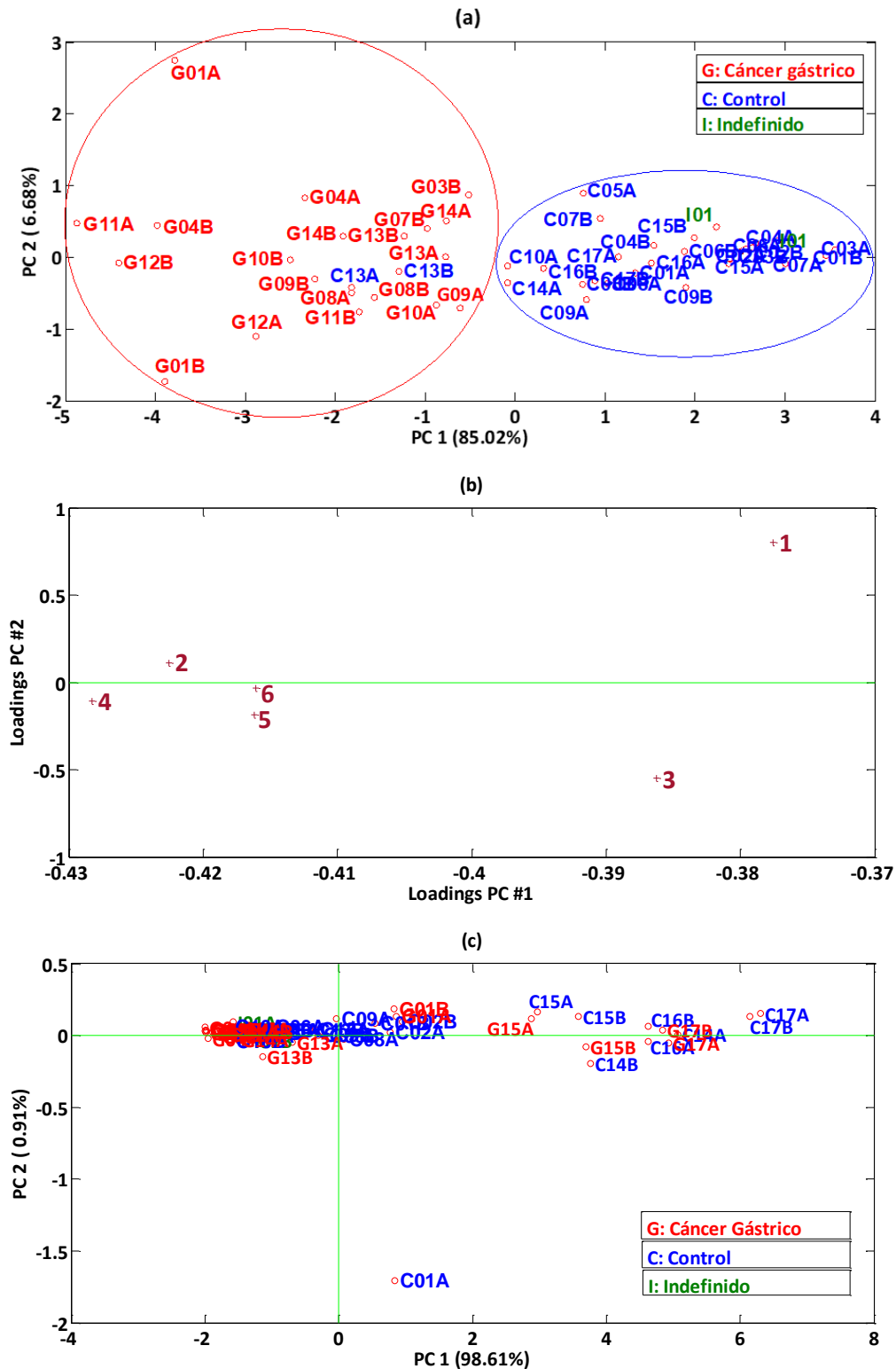
La tasa de acierto obtenida por el modelo de clasificación construido con las respuestas de este sensor está al mismo nivel de precisión de la prueba de endoscopia, que representa el procedimiento de diagnóstico estándar actual para cáncer gástrico. La única muestra clasificada erróneamente por este modelo pertenece al paciente C13, que realizó una exhalación doble durante la adquisición de la muestra de aliento debido a su debilidad física, lo que podría afectar la precisión de los resultados; este paciente también se clasificó erróneamente en el modelo PCA construido con la abundancia de

los biomarcadores de aliento. Otro aspecto a destacar es la clasificación correcta obtenida en el modelo PCA del sensor del paciente de control C07 (el único paciente diagnosticado con úlcera), y del paciente con cáncer gástrico G01 (que se encontraba en un estado de salud muy crítico), que fueron clasificados erróneamente en el modelo de clasificación construido con las abundancias de los biomarcadores. Este resultado se puede atribuir al hecho de que el sensor responde al patrón general de COV que incluye compuestos por debajo del límite de detección o límite de cuantificación del equipo cromatográfico, pero que sin embargo pueden contener trazas importantes de los cambios metabólicos producidos por el cáncer gástrico en el organismo.

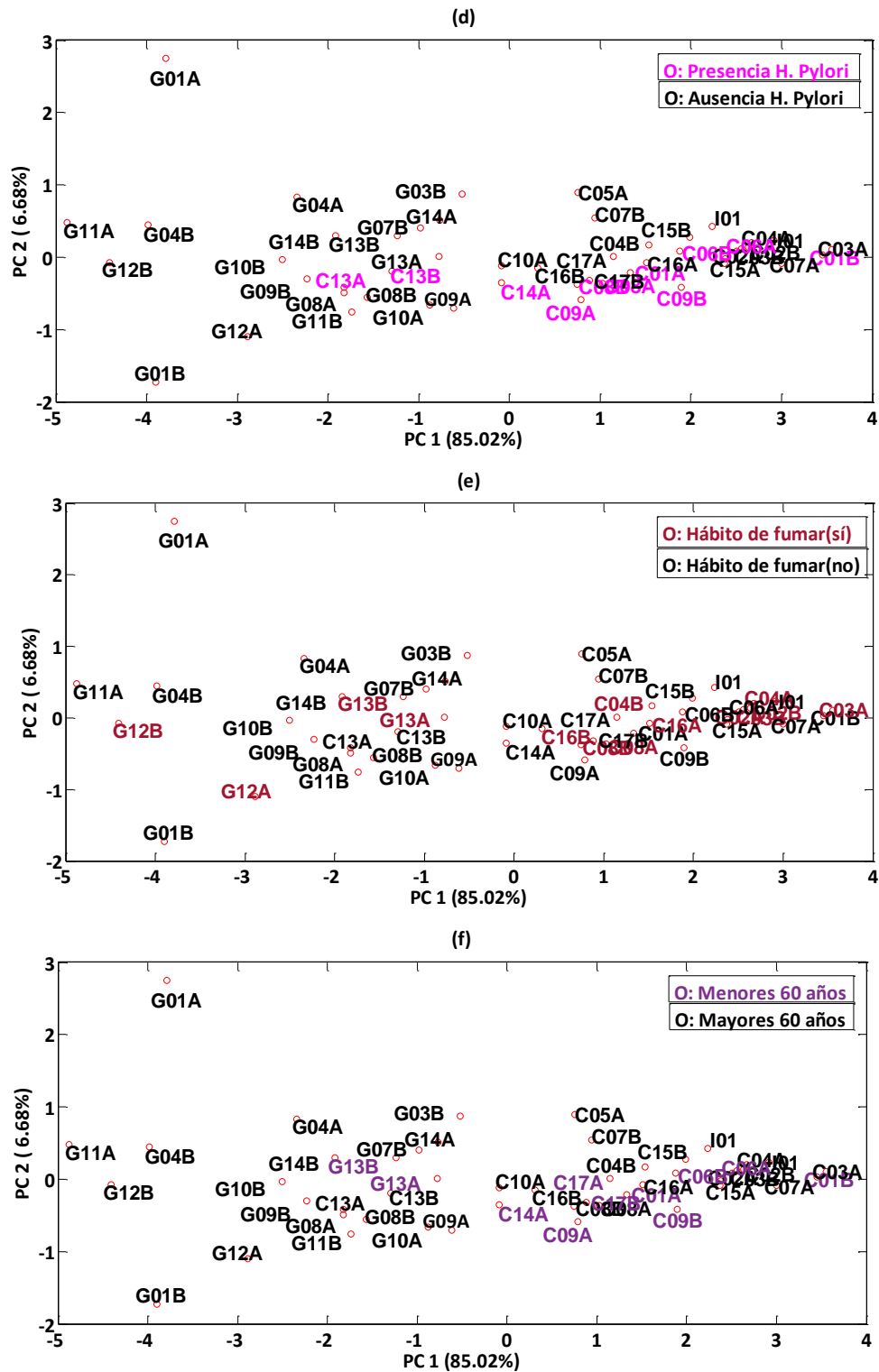
De todos los sensores que conforman el sistema de olfato electrónico, el sensor S10 fue el único capaz de conseguir una buena clasificación entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes del grupo de control, mientras los resultados obtenidos por los demás sensores fueron considerablemente inferiores, tal como se puede ver en el modelo PCA construido con las respuestas del sensor S2, presentado en la figura 5.8(c), en la cual se observa un solapamiento no adecuado de las muestras entre las dos clases de pacientes. Los excelentes resultados obtenidos por el sensor S10 son favorecidos por su funcionalidad orgánica (octadecilamina), con alta afinidad hacia los hidrocarburos alifáticos de cadena larga (incluidos los alcanos y alquenos, que se encontraron como biomarcadores de cáncer gástrico en el presente estudio), debido a su terminación de hidrocarburo C-C.

Además, el modelo de clasificación construido con las respuestas del sensor S10 no se vio afectado por factores de confusión externos, tal como lo demuestra la figura 5.8((d)-(h)), en donde se evidencia la clasificación de los pacientes, utilizando el mismo modelo PCA construido con las respuestas del sensor S10, pero esta vez en función de los factores de confusión más importantes que se pueden encontrar en el aliento de los pacientes con enfermedades gástricas (infección por la bacteria *helicobacter pylori*, el hábito de fumar, la edad, el sexo y la zona de vida). En estas clasificaciones los pacientes quedaron completamente mezclados, lo que conlleva a inferir que dichos factores de

confusión no afectan la clasificación de los pacientes basada en la enfermedad del cáncer gástrico.



Capítulo 5 | Diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis del aliento exhalado



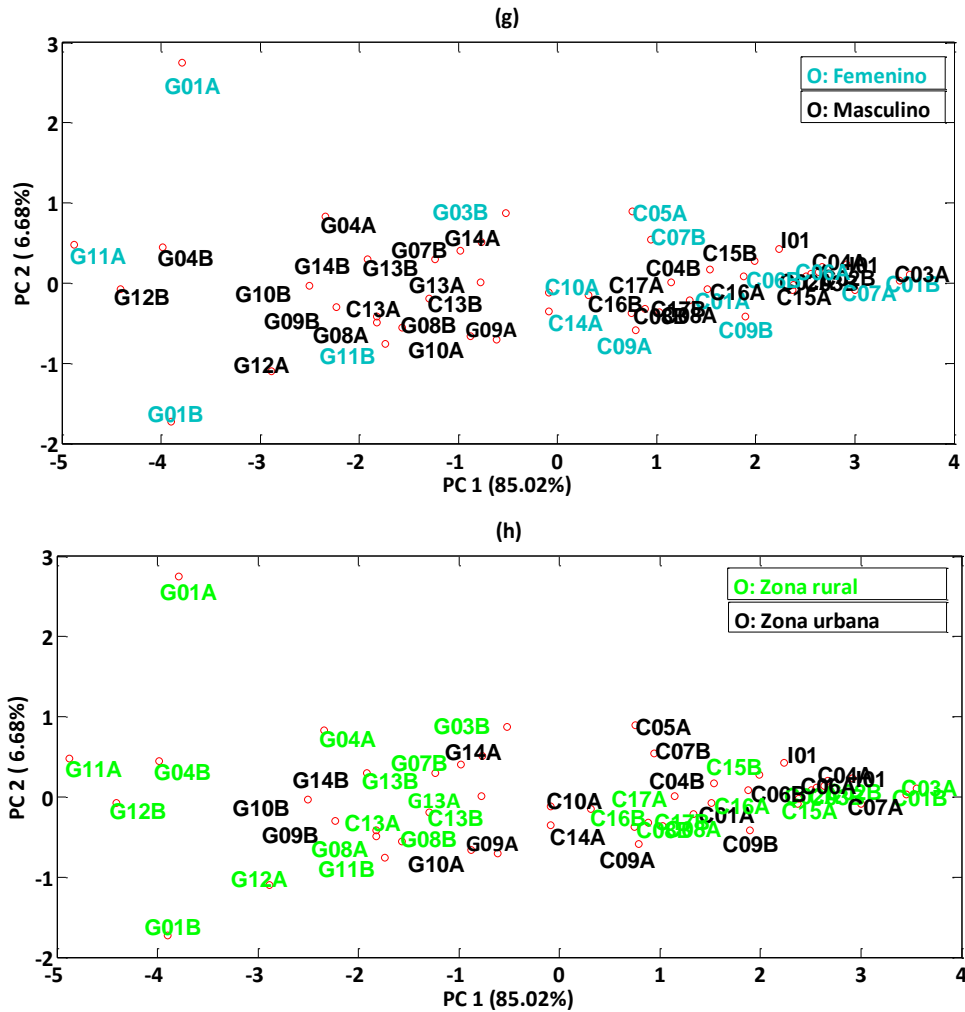


Figura 5.8 Modelo de clasificación PCA construido con las respuestas del sensor S10 basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con octadecilamina. (b) Loadings del modelo PCA construido con las respuestas del sensor S10; (c) Modelo de clasificación PCA construido con las respuestas del sensor S2 basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con 4-metoxi- $\alpha$ -toluenotiol. Clasificación por factores de confusión obtenida con las respuestas del sensor S10: (d) Infección por *H. pylori*; (e) Hábito de fumar; (f) Edad; (g) Sexo; (h) Zona de vida.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son significativamente superiores a los resultados obtenidos en un estudio similar realizado con pacientes chinos, donde las muestras de aliento se midieron con una matriz de 14 sensores de gases basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con 11 compuestos orgánicos diferentes y con bicapas de nanotubos de carbono y derivados orgánicos, donde se consiguió una tasa de acierto de 86% en la clasificación de los pacientes con cáncer gástrico [121]. Aunque en el estudio con pacientes chinos participó un número mayor de voluntarios (130 pacientes con cáncer gástrico, úlcera y otras enfermedades menos severas), el modelo

de clasificación fue construido con un algoritmo supervisado de reconocimiento de patrones, y está propenso a sobre-entrenamiento a pesar de aplicarse la validación cruzada de leave-one-out para estimar la tasa de acierto. Además, ese modelo se construyó con 56 parámetros extraídos de las respuestas de los 14 sensores, que equivale a un porcentaje de 43% con respecto al número de medidas disponibles para construir el modelo, mientras el modelo de clasificación desarrollado en el presente estudio se construyó con 6 parámetros extraídos de las respuestas de un solo sensor (lo que confiere más robustez y menos variabilidad que el empleo de una matriz de 14 sensores), que equivale a un porcentaje de solo 20% con respecto al número de medidas disponibles.

Los resultados significativos obtenidos pueden atribuirse a varias mejoras introducidas en el presente trabajo. Por un lado, el material sensible del sensor se fabricó utilizando una técnica innovadora, que permite la obtención de nanopartículas metálicas ultrapuras [3]. La principal ventaja de esta técnica radica en que las nanopartículas de oro se sintetizan al vacío a partir de la fundición de un metal puro, lo que garantiza producir nanopartículas ultra puras y la obtención de monocapas de nanopartículas de oro enlazadas mediante compuestos orgánicos de alta pureza [126]. De este modo, la respuesta del sensor no se ve influenciada por reacciones de confusión con residuos de síntesis, como puede ser el caso de los materiales sensibles de detección producidos por métodos de química húmeda [127], como los reportados en el estudio previo de cáncer gástrico realizado en una población China. Por otro lado, la técnica de detección propuesta, que comprende ciclos de operación del sensor de 10 segundos seguidos de 90 segundos de inactividad, proporciona un comportamiento dinámico que permite explorar completamente la cinética de reacción entre el material de detección y los volátiles de la respiración bajo pulsos de operación cortos y repetidos.

También cabe enfatizar que el material de detección del sensor que fue capaz de discriminar con excelentes resultados entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes del grupo de control, fue diferente a los materiales de detección que mejor

clasificaron entre sujetos fumadores y no fumadores (resultado presentado en el capítulo 4 de esta tesis), lo cual indica la idoneidad de cada material sensible hacia un cierto patrón característico de volátiles.

Otra observación importante es que, en comparación con otras investigaciones previas, la metodología empleada en este estudio tiene ventajas primordiales en términos de: (i) procedimiento de recolección de muestras de aliento: el paciente respira normalmente a través del dispositivo muestreador de aliento en lugar de realizar un lavado pulmonar extenuante y proporcionar una exhalación profunda, que puede agotar a los pacientes con afecciones gástricas; (ii) medición de muestras: la muestra de aliento se inyecta directamente en la cámara de prueba, sin la necesidad de almacenarse primero en un tubo adsorbente y luego calentarse para liberar los volátiles adsorbidos, con la pérdida inherente de COV; y (iii) simplicidad y confiabilidad del sistema de detección: uso de un solo sensor químico de gases, con una operación y un procedimientos de análisis de datos muy simples, y menos propenso a los artefactos que pueden ser introducidos por una matriz de sensores. Debido a estas ventajas, la prueba se puede realizar directamente en el hospital donde se atiende al paciente, como se hizo en este caso en Colombia.

Mientras que la endoscopia es dolorosa, invasiva, desagradable para el paciente, no está exenta de riesgos y no está ampliamente disponible en los países en desarrollo para realizar un cribado poblacional a gran escala debido a sus elevados costos y la necesidad de personal médico calificado, el método que se ha propuesto en este estudio utiliza muestras biológicas no invasivas (aliento exhalado) que se recogen fácilmente (el paciente solo necesita respirar normalmente a través de un dispositivo de muestreo de aliento), es fácil de realizar, rápido, no es costoso y, por lo tanto, muy adecuado para el cribado entre la población de alto riesgo. Teniendo en cuenta la metodología asequible empleada, esta prueba puede ser repetida fácilmente en caso de dudas. Aunque la validación en grandes cohortes sigue siendo absolutamente necesaria, se puede afirmar que la prueba de diagnóstico desarrollada en este trabajo tiene un excelente potencial

para ser evaluada e introducida en el futuro como un método de pre-diagnóstico a gran escala para cáncer gástrico en Colombia, lo que permitiría la selección de los pacientes que deberían someterse a un análisis más detallado (p. ej., endoscopia y biopsia).

---

## 5.4 CONCLUSIONES

Para el diagnóstico del cáncer gástrico, se realizó un estudio del aliento exhalado proporcionado por una población de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico y con otras enfermedades gástricas que formaron el grupo de control, todos ellos atendidos en el Hospital Universitario la Samaritana de Bogotá, Colombia. En la medida de lo posible, los dos grupos de pacientes fueron apareados por edad, sexo y zona de vida.

Unas de las muestras adquiridas se midieron justo inmediatamente después de su recolección con el sistema de sensores de gases, al ser éste portable y poder ser llevado a las instalaciones del hospital, mientras otras fueron almacenadas en tubos preconcentradores de volátiles y se midieron ulteriormente con el sistema de cromatografía de gases, al no disponerse de este equipo en el hospital.

El análisis cromatográfico de las muestras de aliento reveló la presencia de hasta 650 COV en el aliento de los voluntarios, los más abundantes perteneciendo a los grupos de compuestos químicos de los alquenos, alcanos, alquilos, compuestos aromáticos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y ácidos. 275 compuestos se encontraron en el aliento de más de 70% de los pacientes de cada grupo, y se analizaron estadísticamente aplicando el test t de Student. Cinco compuestos orgánicos volátiles se encontraron en abundancias estadísticamente diferentes en el aliento de los pacientes con cáncer gástrico en comparación con los pacientes con otras enfermedades gástricas después de descartar los compuestos que podrían ser afectados por factores de confusión o provenían de la fibra de SPME utilizada para capturar los COV del aliento e inyectarlo en

el cromatógrafo de gases; éstos se proponen como posibles biomarcadores del cáncer gástrico en el aliento humano. Los compuestos pertenecen a los grupos de compuestos químicos de los alquenos (*trans-2,2-dimetil-3-deceno*), compuestos aromáticos (*m-xileno*) y alcanos (*hexadecano*, *octadecano* y *1-ciclohexil-2-(ciclohexilmetil)pentano*), y son diferentes de los biomarcadores encontrados en otros estudios efectuados en pacientes de China y Letonia, donde se encontraron, además de alquenos y compuestos aromáticos, también cetonas, aldehídos, alcoholes y nitrilos. Estas diferencias se deben a factores genéticos, de alimentación y estilo de vida entre poblaciones de diferentes partes del mundo. El modelo de clasificación no supervisado PCA construido con los biomarcadores encontrados en el presente estudio arrojó una tasa de acierto de 90%, una sensibilidad de 93% y una especificidad de 87%, en la clasificación de los pacientes con cáncer gástrico; dos de los pacientes del grupo de control y un paciente con cáncer gástrico se clasificaron erróneamente.

La medición de las muestras de aliento con el sistema de olfato electrónico desarrollado en este trabajo evidenció el excelente potencial de uno de los sensores para discriminar entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes del grupo de control. El material sensible de este sensor está formado por nanopartículas de oro funcionalizadas con octadecilamina, que es un compuesto orgánico con alta afinidad hacia los hidrocarburos alifáticos de cadena larga, como los alcanos y alquenos que se encontraron como biomarcadores de cáncer gástrico en este estudio. El modelo de clasificación no supervisado PCA construido con los parámetros extraídos de las respuestas de este sensor a las muestras analizadas arrojó una tasa de acierto de 97%, una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93% en la clasificación de los pacientes con cáncer gástrico, solo un paciente del grupo de control siendo clasificado erróneamente; éste también fue clasificado erróneamente por el modelo de clasificación construido con los biomarcadores (se trata de un paciente que realizó una exhalación doble debido a su debilidad física). Este sensor fue el único capaz de conseguir una buena clasificación entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes del grupo de control, mientras los resultados obtenidos por los demás sensores fueron

considerablemente inferiores. El resultado obtenido en este estudio es superior al resultado obtenido en un estudio similar realizado con pacientes de China, donde se obtuvo una tasa de acierto de 86% en la clasificación de los pacientes con cáncer gástrico, al analizar las muestras de aliento con una matriz de 14 sensores de gases.

Los resultados superiores de la prueba del sensor en comparación con el modelo construido con los biomarcadores de cáncer gástrico se pueden atribuir al hecho de que el sensor responde al patrón general de COV que incluye compuestos por debajo del límite de detección o límite de cuantificación del equipo cromatográfico, que sin embargo pueden contener trazas importantes de los cambios metabólicos producidos por el cáncer gástrico en el organismo. Tanto el modelo PCA elaborado con los biomarcadores, como el modelo PCA construido con las respuestas del sensor, no fueron afectados por los factores de confusión más comunes en el aliento de los pacientes con cáncer gástrico, tales como la infección por la bacteria *helicobacter pylori*, el hábito de fumar, la edad, el sexo y la zona de vida. El paciente considerado como indefinido en este estudio, fue un paciente con cáncer gástrico que respondió bien a la quimioterapia, y fue clasificado en el grupo de control por los dos modelos de clasificación.

Cabe destacar que el material de detección del sensor que fue capaz de discriminar con excelentes resultados entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes del grupo de control, fue diferente a los materiales de detección que mejor clasificaron entre sujetos fumadores y no fumadores (resultado presentado en el capítulo 4 de esta tesis), lo cual indica la idoneidad de cada material sensible hacia un cierto patrón característico de volátiles.

Sumados al carácter no invasivo de las muestras de aliento y a la facilidad de la prueba de aliento propuesta en este estudio, los resultados obtenidos son muy prometedores para la evaluación de la idoneidad de la implementación en el futuro de un cribado en la población de alto riesgo a desarrollar cáncer gástrico, para la preselección de los pacientes que deberían someterse a pruebas diagnósticas más completas.



## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES



---

## CONCLUSIONES

En este trabajo doctoral se realizó un estudio del análisis del aire exhalado como un posible método alternativo no invasivo, factible económicamente y fácil de implementar para el cribado del diagnóstico de cáncer gástrico en la población a riesgo.

El estudio se realizó en una cohorte de pacientes con cáncer gástrico y con otras enfermedades gástricas atendidos en el Hospital Universitario la Samaritana de Bogotá, Colombia, que es uno de los países con mayor incidencia del cáncer gástrico del mundo.

Para la recolección de las muestras de aliento se utilizó el muestreador de aliento BioVOC™, comercializado por la empresa Markes International de Reino Unido, caracterizado por ser de fácil manejo, ya que el paciente solo tiene que respirar normalmente a través de él sin necesidad de un lavado de los pulmones o una respiración profunda, que pueden ser extenuantes para un paciente que padece una enfermedad gástrica; además retiene solo los últimos 129 ml del aliento exhalado, que corresponden al aire alveolar, el cuál contiene los compuestos llevados por la sangre a los pulmones, y es él más propicio a contener los metabolitos característicos de las lesiones gástricas.

El análisis cromatográfico de las muestras reveló cinco posibles biomarcadores de cáncer gástrico en el aliento humano, hallados en abundancias estadísticamente diferentes en el aliento de pacientes con cáncer gástrico con respecto a los pacientes con otras enfermedades gástricas. Estos compuestos pertenecen a los grupos de compuestos químicos de los alquenos (trans-2,2-dimetil-3-deceno), compuestos aromáticos (m-xileno) y alcanos (hexadecano, octadecano y 1-ciclohexil-2-(ciclohexilmetil)pentano). Cabe resaltar que estos compuestos son diferentes de los biomarcadores encontrados en los estudios efectuados en pacientes de China y Letonia,

que son otros países con incidencias elevadas del cáncer gástrico, lo que sugiere que factores asociados con la genético, alimentación y estilo de vida deben tomarse en cuenta a la hora de desarrollar el test de aliento para el diagnóstico de cáncer gástrico. El modelo de clasificación construido con los biomarcadores encontrados en el presente estudio produjo una tasa de acierto de 90%, una sensibilidad de 93% y una especificidad de 87%, en la discriminación de los pacientes con cáncer gástrico.

Por otro lado, se desarrolló un sistema de olfato electrónico formado por una matriz de sensores de gases basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con diferentes compuestos orgánicos, que se fabricaron empleando la técnica de deposición en fase de gas avanzada (AGD), a partir de una pieza de metal puro; a diferencia de los nanomateriales fabricados por la técnica convencional de química húmeda, los nanomateriales fabricados en este estudio por AGD son de alta pureza y no contienen rastros de impurezas o compuestos residuales, los cuales interferirían en la respuesta de los sensores a los COV del aliento.

Las pruebas iniciales efectuadas con el sistema de olfato electrónico demostraron que las muestras de aliento deben ser analizadas de inmediato después de su recolección para evitar la pérdida de COV.

Durante la realización de las medidas experimentales, los sensores fueron operados en modo dinámico, aplicando sucesivamente a cada sensor pulsos cortos de voltaje, lo que proporciona un comportamiento dinámico a los sensores, el cual permite explorar completamente la cinética de reacción entre el material de detección y los volátiles de la respiración, y confiere más información que el modo estático de operación, en el cual los sensores son operados a un voltaje constante.

Uno de los sensores, basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con octadecilamina, que es un compuesto orgánico con alta afinidad hacia los hidrocarburos alifáticos de cadena larga como los alcanos y alquenos que se encontraron como

biomarcadores de cáncer gástrico en este estudio, evidenció un excelente potencial para discriminar entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes con otras enfermedades gástricas. El modelo de clasificación no supervisado PCA construido con los parámetros extraídos de las respuestas de este sensor a las muestras analizadas produjo una tasa de acierto de 97%, una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93%, en la discriminación de los pacientes con cáncer gástrico, y está a la par con la precisión de la prueba de endoscopia que representa el procedimiento de diagnóstico estándar actual para cáncer gástrico. Además, el resultado obtenido en este estudio es superior al resultado obtenido en el estudio realizado con pacientes de China, donde se obtuvo una tasa de acierto de 86% en la clasificación de los pacientes con cáncer gástrico, al analizar las muestras de aliento con una matriz de quince sensores de gases.

Por otro lado, cabe destacar que el sensor que obtuvo esta excelente discriminación entre los pacientes con cáncer gástrico y los pacientes con otras enfermedades gástricas, fue diferente a los sensores que mejor clasificaron entre sujetos fumadores y no fumadores, lo que indica la idoneidad de cada material sensible hacia un cierto patrón característico de COV.

El desarrollo de una metodología no invasiva, de fácil uso y manejo para el pre-diagnóstico rápido del cáncer gástrico a través de análisis de muestras de aliento exhalado, es uno de los logros obtenidos durante esta investigación. El sistema de olfato electrónico desarrollado en este trabajo para el diagnóstico de cáncer gástrico podría contribuir significativamente a disminuir los riesgos y costos de los métodos tradicionales de diagnóstico, y establecer criterios de inclusión más acotados para la preselección de los pacientes que deberían someterse a pruebas diagnósticas más completas, y podría convertirse en una herramienta muy importante para el pre-diagnóstico eficaz y rápido del cáncer gástrico en un país como Colombia.

---

## CONCLUSIONS

In this doctoral thesis it was realized a study of the exhaled air as a possible non-invasive, economically affordable and easy to implement alternative method for gastric cancer screening in the high risk population.

The study was realized on a cohort of patients diagnosed with gastric cancer and other gastric diseases attended at the University Hospital Samaritana from Bogotá, Colombia, which is one of the countries with the highest incidence rate of gastric cancer in the World.

For breath samples collection it was employed the BioVOC™ breath sampler, commercialized by Markes International company from UK, which is characterized by its easy use as the patient just needs to breath normally through it without the need for lung wash or deep breathing that can be extenuating for patients with gastric diseases; moreover, this device retains only the last 129 ml of the exhaled breath, which corresponds to the alveolar air that contains metabolites took by the blood to the lungs, and is more likely to contain compounds that are characteristic to gastric lesions.

The chromatographic analysis of the samples evidenced five possible biomarkers of gastric cancer in the exhaled breath, found in statistically different abundances in the breath of patients with gastric cancer and of patients with other gastric diseases. These compounds belong to the chemical groups of alkenes (trans-2,2-dimethyl-3-decene), aromatic compounds (m-xylene) and alkanes (hexadecane, octadecane and 1-cyclohexil-2-cyclohexilmetil-pentane). It should be noted that these compounds are different from the breath biomarkers identified in the studies realized on patients from China and Latvia, which are other countries with high incidence of gastric cancer, suggesting that factors associated with genetic, alimentation and lifestyle needs to be

taken into account at the development of a breath test for gastric cancer diagnosis. The classification model built with the biomarkers found in the present study yielded 90% accuracy, 93% sensitivity and 87% specificity for the discrimination of the gastric cancer patients.

On the other hand, it was developed an electronic olfaction system composed of an array of chemical gas sensors based on different organically-functionalized gold nanoparticles, which were fabricated employing the advanced gas deposition (AGD) technique from a pure metal piece; in difference with the nanomaterials fabricated employing the conventional wet chemistry method, the nanomaterials fabricated in the present study by AGD are of high purity and do not contain traces of impurities or residual compounds that would interfere in sensors responses to the breath volatile organic compounds.

The initial tests performed with the electronic olfaction system revealed that the breath samples have to be analyzed immediately after collection for avoiding the loss of volatile organic compounds.

During the realization of the experimental measurements, the sensors were operated in the dynamic mode by successively applying short voltage pulses to each sensor, which provided a dynamic behavior of the sensors that allows for fully exploring the kinetic reaction between the sensing material and the breath volatiles, and gives more information than the static operation mode in which the sensors are operated at a constant voltage.

One of the sensors, based on gold nanoparticles functionalized with octadecylamine, which is an organic compound with high affinity towards long chain aliphatic hydrocarbons such as alkanes and alkenes that were identified as gastric cancer biomarkers in the present study, showed an excellent potential for discriminating between gastric cancer patients and patients with other gastric diseases. The

unsupervised PCA classification model built with the features extracted from the responses of this sensor to the samples analyzed yielded 97% accuracy, 100% sensitivity and 93% specificity in the discrimination of the gastric cancer patients, which is on par with the accuracy of the endoscopy test that represents the current standard diagnosis procedure for gastric cancer. Furthermore, the results obtained in this study were better than the results obtained in the study realized on Chinese patients, where it was obtained 86% accuracy in the classification of the gastric cancer patients by analyzing the breath samples with an array of 15 chemical gas sensors.

On the other hand, it is worth pointing out that the sensor that obtained this excellent discrimination between gastric cancer patients and patients with other gastric diseases is different from the sensors that better classified between smoker and non-smoker subjects, which indicates the suitability of every sensing material for a certain characteristic volatiles pattern.

The development of a non-invasive and easy to use methodology for the fast prediagnosis of gastric cancer through exhaled breath analysis is one of the main achievements of the research performed in this doctoral thesis. The electronic olfaction system developed could significantly contribute to the decrease of the related risks and costs of the traditional diagnostic methods, and could provide more strict inclusion criteria for the preselection of the patients that should undergo more complete diagnostic tests, therefore it could become a very important tool for the fast and effective prediagnosis of gastric cancer in a country like Colombia.





## BIBLIOGRAFÍA

---



---

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud, "Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles," 2010. [https://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report2010/es/](https://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/es/).
- [2] Organización Mundial de la Salud, "Las 10 principales causas de defunción," 2018. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [3] Organización Mundial de la Salud, "Cancer tomorrow," 2018. <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.
- [4] National Institute of Health, "Tratamiento del cáncer de estómago," 2019. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/estomago/pro/tratamiento-estomago-pdq>.
- [5] Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia, "*Educación médica e investigación*", 2014. <http://www.hus.org.co/index.php?idcategoria=65>
- [6] C. Grávalos, "Cáncer Gástrico," *SEOM*, vol. 1, pp. 1-16, 2015.
- [7] American Cancer Society, "Qué es el cáncer de estómago?," 2017. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-estomago/acerca/que-es-el-cancer-de-estomago.html>
- [8] E. C. Molina and H. P. Sánchez, "Dejar de fumar: factor protector de cáncer gástrico," *Revista Hacia la Promoción de la Salud*, vol. 12, pp. 125-132, 2017
- [9] C. M. Durán-Acevedo, *et al.*, "Exhaled breath analysis for gastric cancer diagnosis in Colombian patients," *Oncotarget*, vol. 9, p. 28805, 2018.
- [10] L. Subirat Esquivel and D. Guillén Isern, "Algunas consideraciones actuales sobre el Cáncer Gástrico," *Revista Archivo Médico de Camagüey*, vol. 15, pp. 400-411, 2011.

## Bibliografía

- [11] A. Hierro González, *et al.*, "Clinical, epidemiological, endoscopic and histological behavior of epithelial gastric cancer," *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 35, pp. 48-64, 2016.
- [12] F. R. Montero, "Cáncer gástrico: Diagnóstico y manejo," *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, vol. 71, pp. 339-342, 2014.
- [13] J. Pereira, *et al.*, "Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: an overview," *Metabolites*, vol. 5, pp. 3-55, 2015.
- [14] L. Pauling, *et al.*, "Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 68, pp. 2374-2376, 1971.
- [15] M. Phillips, *et al.*, "Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans," *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 729, pp. 75-88, 1999.
- [16] R. A. Dweik and A. Amann, "Exhaled breath analysis: the new frontier in medical testing," *Journal of Breath Research*, vol. 2, p. 030301, 2008.
- [17] K.-H. Kim, *et al.*, "A review of breath analysis for diagnosis of human health," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 33, pp. 1-8, 2012.
- [18] W. Cao and Y. Duan, "Current status of methods and techniques for breath analysis," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 37, pp. 3-13, 2007.
- [19] T. H. Risby and S. F. Solga, "Current status of clinical breath analysis," *Applied Physics B*, vol. 85, pp. 421-426, 2006.
- [20] J. D. Fenske and S. E. Paulson, "Human breath emissions of VOCs," *Journal of the Air & Waste Management Association*, vol. 49, pp. 594-598, 1999.
- [21] A. Amann, *et al.*, "The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva," *Journal of Breath Research*, vol. 8, p. 034001, 2014.

## Bibliografía

- [22] S. Pavagadhi and R. Balasubramanian, "Quantitative analysis of vocs in exhaled breath from asian volunteers: A pilot study," *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, vol. 5, p. 1, 2014.
- [23] H. Haick, *et al.*, "Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers," *Chemical Society Reviews*, vol. 43, pp. 1423-1449, 2014.
- [24] P. J. Mazzone, "Analysis of volatile organic compounds in the exhaled breath for the diagnosis of lung cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 3, pp. 774-780, 2008.
- [25] E. Aghdassi, *et al.*, "Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress: a randomized controlled trial," *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 98, pp. 348-353, 2003.
- [26] C. F. Kneepkens, *et al.*, "The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 17, pp. 127-160, 1994.
- [27] T. H. Risby and S. S. Sehnert, "Clinical application of breath biomarkers of oxidative stress status," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, pp. 1182-1192, 1999.
- [28] D. Kohlmuller and W. Kochen, "Is n-pentane really an index of lipid peroxidation in humans and animals? A methodological reevaluation," *Analytical Biochemistry*, vol. 210, pp. 268-276, 1993.
- [29] B. G. Stone, *et al.*, "Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men," *Lipids*, vol. 28, pp. 705-708, 1993.
- [30] J. Kuzma, *et al.*, "Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene," *Current Microbiology*, vol. 30, pp. 97-103, 1995.
- [31] W. M. Foster, *et al.*, "Breath isoprene: temporal changes in respiratory output after exposure to ozone," *Journal of Applied Physiology*, vol. 80, pp. 706-710, 1996.

## Bibliografía

- [32] S. Mendis, *et al.*, "Expired hydrocarbons in patients with acute myocardial infarction," *Free Radical Research*, vol. 23, pp. 117-122, 1995.
- [33] K. Cope, *et al.*, "Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis," *Gastroenterology*, vol. 119, pp. 1340-1347, 2000.
- [34] P. L. Davis, *et al.*, "Endogenous isopropanol: forensic and biochemical implications," *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 8, pp. 209-212, 1984.
- [35] P. W. Scislawski and K. Pickard, "The regulation of transaminative flux of methionine in rat liver mitochondria," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 314, pp. 412-416, 1994.
- [36] M. L. Simenhoff, *et al.*, "Biochemical profile of uremic breath," *New England Journal of Medicine*, vol. 297, pp. 132-135, 1977.
- [37] B. Halliwell, *et al.*, "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?," *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 119, pp. 598-620, 1992.
- [38] D. B. Barr, *et al.*, "Biologic monitoring of exposure to environmental chemicals throughout the life stages: requirements and issues for consideration for the National Children's Study," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, pp. 1083-1091, 2005.
- [39] J. Kwak and G. Preti, "Volatile disease biomarkers in breath: a critique," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 12, pp. 1067-1074, 2011.
- [40] J. D. Pleil, *et al.*, "Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders," *Journal of Breath Research*, vol. 7, p. 017107, 2013.
- [41] J. Caro and M. Gallego, "Environmental and biological monitoring of volatile organic compounds in the workplace," *Chemosphere*, vol. 77, pp. 426-433, 2009.

## Bibliografía

- [42] L. E. Gustafsson, *et al.*, "Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 181, pp. 852-857, 1991.
- [43] S. A. Kharitonov and P. J. Barnes, "Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath," *Biomarkers*, vol. 7, pp. 1-32, 2002.
- [44] E. P. Diamandis (ed.), "Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology, and clinical applications," *Amer. Assoc. for Clinical Chemistry*, 2002.
- [45] J. Roulston, "Limitations of tumour markers in screening," *British Journal of Surgery*, vol. 77, pp. 961-962, 1990.
- [46] P. Mochalski, *et al.*, "Blood and breath levels of selected volatile organic compounds in healthy volunteers," *The Analyst*, vol. 138, pp. 2134-2145, 2013.
- [47] O. Lawal, *et al.*, "Exhaled breath analysis: a review of 'breath-taking' methods for off-line analysis," *Metabolomics*, vol. 13, p. 110, 2017.
- [48] I. Horváth, *et al.*, "A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease," *European Respiratory Journal*, vol. 49, p. 1600965, 2017.
- [49] American Thoracic Society, "European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 171, pp. 912-930, 2005.
- [50] F. I. Khan and A. K. Ghoshal, "Removal of volatile organic compounds from polluted air," *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, vol. 13, pp. 527-545, 2000.
- [51] C. M. Robroeks, *et al.*, "Exhaled volatile organic compounds predict exacerbations of childhood asthma in a 1-year prospective study," *European Respiratory Journal*, vol. 42, pp. 98-106, 2013.

## Bibliografía

- [52] J. W. Dallinga, *et al.*, "Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children," *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 40, pp. 68-76, 2010.
- [53] D. Smith, *et al.*, "Mass spectrometry for real-time quantitative breath analysis," *Journal of Breath Research*, vol. 8, p. 027101, 2014.
- [54] D. Poli, *et al.*, "Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME–GC/MS," *Journal of Chromatography B*, vol. 878, pp. 2643-2651, 2010.
- [55] M. Phillips, *et al.*, "Detection of lung cancer with volatile markers in the breath," *Chest*, vol. 123, pp. 2115-2123, 2003.
- [56] D. Poli, *et al.*, "Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study," *Respiratory Research*, vol. 6, p. 71, 2005.
- [57] A. Ulanowska, *et al.*, "Chemotherapy control by breath profile with application of SPME-GC/MS method," *Journal of Separation Science*, vol. 35, pp. 2908-2913, 2012.
- [58] M. Caldeira, *et al.*, "Profiling allergic asthma volatile metabolic patterns using a headspace-solid phase microextraction/gas chromatography based methodology," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, pp. 3771-3780, 2011.
- [59] A. Krilaviciute, *et al.*, "Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review," *Oncotarget*, vol. 6, pp. 38643-38657, 2015.
- [60] Supelco, "A tool for selecting an adsorbent for thermal desorption applications," *Technical Report, Supelco*, 2014.
- [61] G. D. Wight, "Fundamentals of air sampling," *CRC Press*, 1994.
- [62] Agilent Technologies, "CrysAlis<sup>Pro</sup>," *Yarnton, England*, 2010.
- [63] S. W. Harshman, *et al.*, "Storage stability of exhaled breath on Tenax TA," *Journal of Breath Research*, vol. 10, p. 046008, 2016.

## Bibliografía

- [64] B. Henderson, *et al.*, "Laser spectroscopy for breath analysis: towards clinical implementation," *Applied Physics. B, Lasers and Optics*, vol. 124, pp. 161-161, 2018.
- [65] "Cromatografía de gases," *Museo Nacional de Ciencias Naturales, España*, [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf).
- [66] A. B. Littlewood, "Gas chromatography: Principles, techniques, and applications," *Elsevier Science*, 2013.
- [67] "Cromatografía de gases: cómo funciona, tipos, partes, aplicaciones," *Lifeder*, <https://www.lifeder.com/cromatografia-de-gases>.
- [68] R. Teranishi, *et al.*, "Gas chromatography of volatiles from breath and urine," *Analytical Chemistry*, vol. 44, pp. 18-20, 1972.
- [69] L. M. Blumberg, "Chapter 2 - Theory of gas chromatography," in *Gas Chromatography*, C. F. Poole, Ed., ed Amsterdam: Elsevier, pp. 19-78, 2012.
- [70] P. K. Gupta, "The 2004 Nobel Prize in Physiology or Medicine: 'Odorant receptors and organization of the olfactory system'," *Current Science*, vol. 87, pp. 1500-1504, 2004.
- [71] R. Lacey and G. Osborn, "Application of electronic noses in measuring biological systems," in *ASAE Annual International Meeting*, pp. 98-6116, 1998.
- [72] A. Montenegro, *et al.*, "Nariz electrónica inalámbrica móvil con moitoreo en tiempo real," *Revista de Iniciación Científica*, vol. 1, pp. 59-65, 2015.
- [73] P. Mielle, "'Electronic noses': Towards the objective instrumental characterization of food aroma," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 7, pp. 432-438, 1996.
- [74] W. F. Wilkens and J. D. Hartman, "An electronic analog for the olfactory processes," *Journal of Food Science*, vol. 29, pp. 372-378, 1964..

## Bibliografía

- [75] K. Persaud and G. Dodd, "Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose," *Nature*, vol. 299, p. 352, 1982.
- [76] E. L. Hines, *et al.*, "Electronic noses: a review of signal processing techniques," *IEE Proceedings - Circuits, Devices and Systems*, vol. 146, pp. 297-310, 1999.
- [77] A. Wilson, "Advances in electronic-nose technologies for the detection of volatile biomarker metabolites in the human breath," *Metabolites*, vol. 5, p. 140, 2015.
- [78] S. E. Zohora, *et al.*, "Chemical sensors employed in electronic noses: A review," *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 177-184, 2013.
- [79] I. Moreno, *et al.*, "La nariz electrónica: Estado del arte," *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, vol. 6, pp. 76-91, 2009.
- [80] A. Manolis, "The diagnostic potential of breath analysis," *Clinical Chemistry*, vol. 29, pp. 5-15, 1983.
- [81] N. S. Lewis, "Comparisons between mammalian and artificial olfaction based on arrays of carbon black – polymer composite vapor detectors," *Accounts of Chemical Research*, vol. 37, pp. 663-672, 2004.
- [82] J. Fraden, "Handbook of modern sensors: Physics, designs, and applications," *Springer*, 2004.
- [83] M. Hartwig, *et al.*, "Inkjet-printed wireless chemiresistive sensors - A Review," *Chemosensors*, vol. 6, p. 66, 2018.
- [84] A. D. Wilson, "Application of electronic-nose technologies and VOC-biomarkers for the noninvasive early diagnosis of gastrointestinal diseases," *Sensors*, vol. 18, p. 2613, 2018.
- [85] T. C. Pearce, *et al.*, "Handbook of machine olfaction: electronic nose technology," *John Wiley & Sons*, 2006.
- [86] T. Eklöv, *et al.*, "Monitoring sausage fermentation using an electronic nose," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 76, pp. 525-532, 1998.

## Bibliografía

- [87] C. Distante, *et al.*, "Support vector machines for olfactory signals recognition," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 88, pp. 30-39, 2003.
- [88] R. Fuoco, *et al.*, "Analysis of priority pollutants in environmental samples by on-line supercritical fluid chromatography cleanup–cryo-trap–gas chromatography–mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 846, pp. 387-393, 1999.
- [89] K. D. Oliver, *et al.*, "Technique for monitoring toxic VOCs in air: sorbent preconcentration, closed-cycle cooler cryofocusing, and GC/MS analysis," *Environmental Science & Technology*, vol. 30, pp. 1939-1945, 1996.
- [90] M. Salamero Gil, "Microextracción en fase sólida: aplicaciones de interés farmacéutico," *Universidad de Sevilla*, 2017.
- [91] E. E. Stashenko and J. R. Martínez, "Derivatization and solid-phase microextraction," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 553-561, 2004.
- [92] M. de Fatima Alpendurada, "Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis," *Journal of Chromatography A*, vol. 889, pp. 3-14, 2000.
- [93] H. Lord and J. Pawliszyn, "Evolution of solid-phase microextraction technology," *Journal of Chromatography A*, vol. 885, pp. 153-193, 2000.
- [94] R. Eisert and J. Pawliszyn, "New trends in solid-phase microextraction," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 27, pp. 103-135, 1997.
- [95] M. Walles, *et al.*, "Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 30, pp. 307-319, 2002.
- [96] J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction: theory and practice," *John Wiley & Sons*, 1997.

## Bibliografía

- [97] E. Castaños. "Lidia con la química", 2015. <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/04/parametros-cromatograficos/>.
- [98] T. Cohen, "Telemorphosis: theory in the era of climate change, vol. 1," *Open Humanities Press*, 2012.
- [99] Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines, "El cromatograma," <https://www.secyta.es/es/node/25>.
- [100] J. M. Bland and D. G. Altman, "Statistics notes: Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 1—correlation within subjects," *Bmj*, vol. 310, p. 446, 1995.
- [101] S. L. Zabell, "On student's 1908 article "The probable error of a mean"," *Journal of the American Statistical Association*, vol. 103, pp. 1-7, 2008.
- [102] B. Dawson-Saunders and R. G. Trapp, "Bioestadística Médica Editorial el Manual Moderno," *México DF*, pp. 143-166, 1993.
- [103] U. Tisch and H. Haick, "Nanomaterials for cross-reactive sensor arrays," *MRS bulletin*, vol. 35, pp. 797-803, 2010.
- [104] M. Brust, *et al.*, "Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles," *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 1655-1656, 1995.
- [105] C. Granqvist and R. Buhrman, "Ultrafine metal particles," *Journal of Applied Physics*, vol. 47, pp. 2200-2219, 1976.
- [106] S. Malola and H. Häkkinen, "Electronic structure and bonding of icosahedral core-shell gold-silver nanoalloy clusters  $Au_{144-x}Ag_x$  (SR) 60," *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 2, pp. 2316-2321, 2011.
- [107] H. Grönbeck, *et al.*, "Thiols and disulfides on the Au (111) surface: The headgroup-gold interaction," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, pp. 3839-3842, 2000.

## Bibliografía

- [108] A. J. McIntosh, *et al.*, "Methods of synthesis and purification of ionic liquids," in *Application, Purification, and Recovery of Ionic Liquids*, ed: Elsevier, pp. 59-99, 2016.
- [109] W. P. Wuelfing, *et al.*, "Electronic conductivity of solid-state, mixed-valent, monolayer-protected Au clusters," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, pp. 11465-11472, 2000.
- [110] S. Chen and J. M. Sommers, "Alkanethiolate-protected copper nanoparticles: spectroscopy, electrochemistry, and solid-state morphological evolution," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, pp. 8816-8820, 2001.
- [111] A. P. Lee and B. J. Reedy, "Temperature modulation in semiconductor gas sensing," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 60, pp. 35-42, 1999.
- [112] H. Haick, "Chemical sensors based on molecularly modified metallic nanoparticles," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 40, p. 7173, 2007.
- [113] H. Zhang, *et al.*, "Vapour sensing using surface functionalized gold nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 13, p. 439, 2002.
- [114] W. H. Steinecker, *et al.*, "Model of vapor-induced resistivity changes in gold-thiolate monolayer-protected nanoparticle sensor films," *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 4977-4986, 2007.
- [115] X. Lu, *et al.*, "Characterization of complex hydrocarbons in cigarette smoke condensate by gas chromatography–mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1043, pp. 265-273, 2004.
- [116] C. B. Ambrosone, "Oxidants and antioxidants in breast cancer," *Antioxidants & redox signaling*, vol. 2, pp. 903-917, 2000.
- [117] K. H. Vousden and K. M. Ryan, "p53 and metabolism," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, pp. 691-700, 2009.

## Bibliografía

- [118] A. Van Gossum and J. Decuyper, "Breath alkanes as an index of lipid peroxidation," *European Respiratory Journal*, vol. 2, pp. 787-791, 1989.
- [119] H. Amal, *et al.*, "Detection of precancerous gastric lesions and gastric cancer through exhaled breath," *Gut*, vol. 65, pp. 400-407, 2016.
- [120] C. M. Kneepkens, *et al.*, "The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 17, pp. 127-60, 1994.
- [121] Z. q. Xu, *et al.*, "A nanomaterial-based breath test for distinguishing gastric cancer from benign gastric conditions," *Br J Cancer*, vol. 108, pp. 941-950, 2013.
- [122] H. Amal, *et al.*, "Geographical variation in the exhaled volatile organic compounds," *Journal of Breath Research*, vol. 7, p. 047102, 2013.
- [123] D. M. Parkin, *et al.*, "Global cancer statistics, 2002," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 55, pp. 74-108, 2005.
- [124] G. J. Krejs, "Gastric cancer: epidemiology and risk factors," *Digestive Diseases*, vol. 28, pp. 600-603, 2010.
- [125] C. Hamashima, *et al.*, "The Japanese guidelines for gastric cancer screening," *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 38, pp. 259-267, 2008.
- [126] R. Ionescu, *et al.*, "Fabrication of ultra-pure gold nanoparticles capped with dodecanethiol for Schottky-diode chemical gas sensing devices," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 239, pp. 455-461, 2017.
- [127] M. Brust, *et al.*, "Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles," *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, vol. 16, pp. 1655-1656, 1995.





## ABREVIACIONES



---

## **ABREVIACIONES**

AGD: Deposición en fase de gas avanzada

AuNP: Nanopartículas de oro

CG: Cáncer gástrico

COV: Compuestos orgánicos volátiles

ENT: Enfermedades no transmisibles

GC: Cromatografía de gases

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GC-QTOF-MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo

MS: Espectrometría de masas

NE: Nariz electrónica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: Análisis de componentes principales

PTR-MS: Espectrometría de masas por reacción de transferencia de protones

RNA: Redes neuronales artificiales

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SIFT-MS: Espectrometría de masas con tubo de flujos de iones

SPE: Extracción de fase sólida

SPME: Microextracción en fase sólida

SVM: Máquinas de soporte vectorial



## PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA



---

## PUBLICACIONES

1. C.M. Durán-Acevedo, **A.L. Jaimes-Mogollón**, O.E. Gualdrón-Guerrero, T.G. Welearegay, J.D. Martínez-Marín, J.M. Cáceres-Tarazona, Z.C. Sánchez-Acevedo, K.J. Beleño-Saenz, U. Cindemir, L. Österlund, R. Ionescu. “Exhaled breath analysis for gastric cancer diagnosis in Colombian patients”. *Oncotarget* 9(48), 28805-28817 (2018). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25331>.
2. T.G. Welearegay, O.E. Gualdrón, **A.L. Jaimes**, J.M. Cáceres, G. Pugliese, U. Cindemir, C.M. Durán, L. Österlund, R. Ionescu. “Ultrapure organically modified gold nanoparticles for breath analysis”. *Procedia Engineering* 168, 133-136 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.11.176>.
3. **A.L. Jaimes**, C.M. Durán, O.E. Gualdrón, S.R. Ionescu. “Stomach cancer detection through exhaled breath using biomarkers analysis”. *Chemical Engineering Transactions* 68, 43-48 (2018). <https://doi.org/10.3303/CET1868008>.
4. T.G. Welearegay, C.M. Durán-Acevedo, **A.L. Jaimes-Mogollón**, G. Pugliese, F. Ionescu, O.G. Pérez-Ortiz, O.E. Gualdrón-Guerrero, U. Cindemir, L. Österlund, R. Ionescu. “Exhaled air analysis as a potential fast method for early diagnosis of dengue diseases”. *Sensors and Actuators B* 310, 127859 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127859>
5. T. Saidi, M. Moufid, K.J. Beleño-Saenz, T.G. Welearegay, N. El Bari, **A.L. Jaimes-Mogollón**, R. Ionescu, J.E. Bourkadi, J. Benamor, M. El Ftouh, B. Bouchikhi. “Non-invasive prediction of lung cancer histological types through exhaled breath analysis by UV-irradiated electronic nose and GC/QTOF/MS”. *Sensors and Actuators B* 311, 127932 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127932>.

6. A. Kwiatkowski, T. Chludziński, T. Saidi, T.G. Welearegay, **A.L. Jaimes-Mogollón**, N. El Bari, S. Borys, B. Bouchikhi, J. Smulko,, R. Ionescu. "Assessment of electronic sensing techniques for the rapid identification of alveolar echinococcosis through exhaled breath analysis". *Sensors* 20, 2666 (2020). <https://doi:10.3390/s20092666>.

7. M. Brebu, **L. Mogollón**, R. Ionescu, D. Turcu, P. Grigorescu, A. Iordache, "Volatolomic analysis applied to farm animals. III. Volatile compounds emitted through skin of cattle". *The Romanian Review of Veterinary Medicine* 30 (2), 29-32 (2020).

---

## CONFERENCIAS

1. T.G. Welearegay, O.E. Gualdrón, **A.L. Jaimes**, J.M. Cáceres, G. Pugliese, U. Cindemir, C.M. Durán, L. Österlund, R. Ionescu. "Ultrapure organically modified gold nanoparticles for breath analysis". 30th Euroensors Conference, Budapest, Hungría, Septiembre 4-7, 2016. Póster.

2. O.E. Gualdrón, T.G. Welearegay, **A.L. Jaimes**, J.M. Cáceres, C.M. Durán, R. Ionescu, M. Maestre, G. Pugliese. "Exhaled breath analysis of smokers and nonsmokers using sensors based ultrapure organically modified gold nanoparticles". VII Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2016, Bucaramanga, Santander, Colombia, Octubre 26-28, 2016. Ponencia oral. IFMBE Proceedings, vol 60. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4086-3\\_183](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4086-3_183).

3. R. Ionescu, T.G. Welearegay, U. Cindemir, O.E. Gualdrón, **A.L. Jaimes**, J.M. Cáceres, C.M. Durán, L. Österlund, "Fabrication of ultrapure monolayer capped Au

nanoparticles chemical gas sensors for breath analysis". BIT 5th Annual Conference of AnalytiX-2017, Fukuoka, Japón, Marzo 22-24, 2017. **Ponencia invitada.**

4. T.G. Welearegay, **A.L. Jaimes Mogollón**, O.E. Guerrero, C. Durán Acevedo, R. Ionescu. "Ligand-capped AuNPs gas sensor array for gastric cancer diagnosis in exhaled breath". Graduate Student Meeting on Electronics Engineering 2017, Tarragona, España, Junio 29-30, 2017. **Ponencia oral.**

5. **A.L. Jaimes**, C.M. Durán, O.E. Gualdrón, S.R. Ionescu. "Stomach cancer detection through exhaled breath using biomarkers analysis". 6<sup>th</sup> International Conference on Environmental Odour Monitoring & Control. Milan, Italia, Septiembre 9-12, 2018. **Ponencia oral.**

6. **A.L. Jaimes Mogollón**, C.M. Durán Acevedo. "Electronic nose device for diagnosis of gastric cancer through biological markers". XIII Congreso Internacional Electrónica y Tecnologías de Avanzada. Pamplona, Colombia, Septiembre 12-14, 2018. **Póster.**

7. K. Beleño-Sáenz, J. Caceres, **L. Jaimes**, O. Gualdrón, R. Ionescu. "Assessment of bovine tuberculosis diagnosis in swine through breath and feces VOCs analysis with gold nanoparticles chemical gas sensors". bTB-Test Workshop "Multisensorial systems analysis for biomedical applications", Uppsala, Suecia, Marzo 13, 2019. **Ponencia invitada.**

8. **A.L. Jaimes**, S.R. Ionescu. "Principal Component Analysis applied to signals for gastric cancer screening". Seminar Institute of Macromolecular Chemistry Petru Poni, Iasi, Rumania, Abril 8, 2019. **Ponencia oral.**

9. M. Brebu, **L. Mogollón**, R. Ionescu, D. Turcu, P. Grigorescu, A. Iordache. "Analiza volatolomica aplicata animalelor de ferma. Compusi volatili eliminati prin pielea vacilor

/ Volatolomic analysis applied to farm animals. Volatile compounds emmited through skin of cattle". Sesiunea științifică anuală a cadrelor didactice, University Spiru Haret, Bucarest, Rumania, Mayo 16, 2019. Ponencia oral.

10. **A.L. Jaimes-Mogollón**, C. Durán, O. Gualdrón, T. Welearegay, R. Ionescu. "Development of an artificial sensorial perception system for the detection of gastric cancer in the exhaled breath". Academic Days of Iasi, 27<sup>th</sup> Edition of the Progresses in the Science of Organic and Macromolecular Compounds Symposium MACRO Iasi 2019, Iasi, Rumania, Octubre 2-4, 2019. **Ponencia invitada.**

11. **A.L. Jaimes-Mogollón**, "Desarrollo de un sistema de percepción sensorial artificial para la detección del cáncer gástrico en el aliento exhalado". VI Encuentro Nacional de Investigación Aplicada e Innovación, Sincelejo – Sucre, Colombia, Noviembre 14-15, 2019. **Ponencia invitada.**