



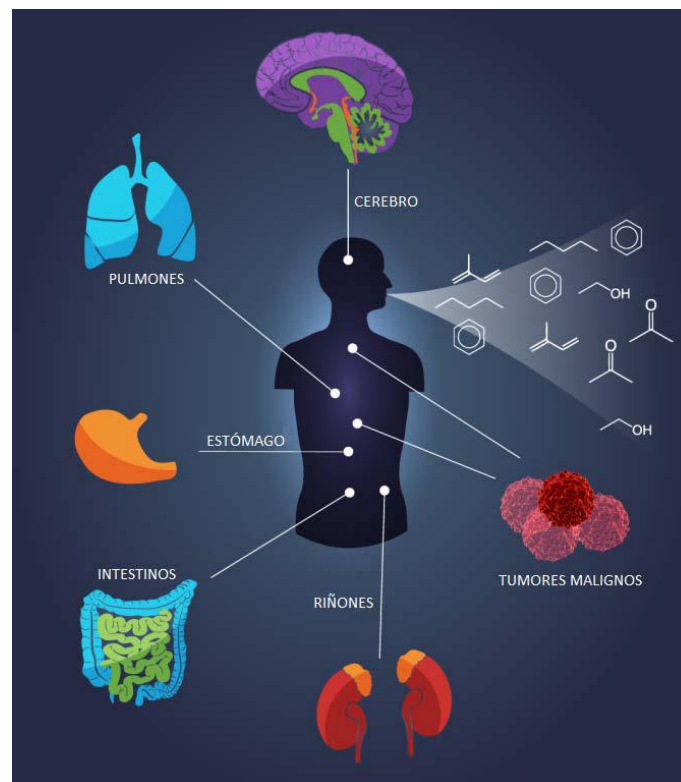
Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



Trabajo Fin de Grado

BIOMARCADORES VOLÁTILES PARA LA DETECCIÓN DE ESTADOS PATOLÓGICOS



Rodrigo González Acosta



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica



Grado en Farmacia

BIOMARCADORES VOLÁTILES PARA LA DETECCIÓN DE ESTADOS PATOLÓGICOS

Trabajo Fin de Grado

Revisión Bibliográfica

Autor: Rodrigo González Acosta

Tutoras: María Teresa Morales Millán y María Teresa Montaña González

Sevilla, Julio 2020

ÍNDICE	Pág.
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Biomarcadores	3
1.2. Biomarcadores no volátiles	5
1.2.1. Biomarcadores en Alzheimer	5
1.2.2. Biomarcadores en enfermedades cardiovasculares	5
1.2.3. Biomarcadores en cáncer de próstata	7
1.3. Biomarcadores volátiles	8
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGÍA	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Compuestos orgánicos volátiles	11
4.1.1. Compuestos volátiles de interés en clínica (Biomarcadores volátiles)	11
4.2. Biomarcadores volátiles en patologías	13
4.2.1. Biomarcadores volátiles en la enfermedad obstructiva crónica	13
4.2.2. Biomarcadores volátiles en cáncer	14
4.2.3. Biomarcadores volátiles en la enfermedad de Crohn	15
4.2.4. Biomarcadores volátiles en la enfermedad hepática crónica	16
4.3. Metodología analítica	16
4.3.1. Toma de muestra	17
4.3.2. Preparación de la muestra	18
4.3.2.1. Procedimientos que no requieren preconcentración	18
4.3.2.2. Procedimientos que requieren de preconcentración	19
4.3.3. Técnicas analíticas	23
4.3.3.1. Nariz electrónica	23
4.3.3.2. Reacción de transferencia de protones-Espectrometría de masas (PTR-MS)	24
4.3.3.3. Tubo de flujo de iones-Espectrometría de masas (SIFT-MS)	25
4.3.3.4. Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS)	26
4.3.3.5. Espectrometría de movilidad iónica-Espectrometría de masas (IMS-MS)	27
4.3.3.6. Volatolómica	27
4.3.4. Evolución temporal y aplicaciones de interés en distintas patologías	28
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

Un biomarcador es una molécula que indica un estado biológico. Los biomarcadores volátiles son compuestos orgánicos que se originan en el ser humano como consecuencia de procesos que tienen lugar en el organismo y que, debido a diversas enfermedades, pueden sufrir alteraciones, lo que puede ayudar a identificar la patología en cuestión.

El objetivo de este trabajo es estudiar los biomarcadores volátiles que se utilizan en la detección de patologías, evaluando su importancia para la detección y diagnóstico precoz de diversas enfermedades. El trabajo revisa algunas de las enfermedades más importantes en las que se está haciendo uso de estos biomarcadores y los métodos analíticos utilizados para su determinación.

Se ha llevado a cabo una recopilación de los diferentes procedimientos utilizados en la preparación de muestra y medida de biomarcadores volátiles y se ha estudiado la evolución temporal de las investigaciones centradas en ellos, poniéndose de manifiesto diferentes aplicaciones analíticas que se están implementando en la actualidad.

Muchas de las enfermedades con alta prevalencia a nivel mundial, como son el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el cáncer del pulmón o la EPOC, pueden ser detectadas y diagnosticadas de una manera eficaz y precoz gracias a los biomarcadores volátiles.

Este tema se ha convertido en un foco importante de investigación a nivel mundial debido a las ventajas que presenta, ya que además de ser capaz de evitar el avance de enfermedades gracias a su rápido diagnóstico, es un procedimiento no invasivo muy bien tolerado y aceptado por los pacientes. Sin embargo, aunque actualmente es un tema en estudio, aún quedan avances por conseguir para lograr alcanzar una precisión que permita poder aplicarlo con total autonomía y fiabilidad. En el futuro el uso de biomarcadores volátiles en la detección de estados patológicos podría ser uno de los principales métodos de diagnóstico empleados.

Palabras clave: Biomarcadores, compuestos orgánicos volátiles, patologías, análisis, diagnóstico no invasivo.

1. INTRODUCCIÓN

Los analitos volátiles son objeto de determinaciones analíticas desde hace mucho tiempo debido a su interés como marcadores o biomarcadores de distintos procesos. A lo largo del tiempo se han estudiado en diferentes matrices, ya que pueden ofrecer información relevante, principalmente porque los compuestos volátiles juegan un papel importante en la naturaleza como compuestos que actúan como mensajeros para transmitir información selectiva. De esta forma, el interés por este tipo de analitos en diversas áreas de Ciencias de la Vida ha ido aumentando durante las últimas décadas (Herrmann, 2010).

Gran parte de ese interés ha venido desde el campo de la Tecnología de los Alimentos o el Medio Ambiente, donde se conoce desde antiguo el papel relevante que poseen, en el primer caso por estar directamente relacionados con las propiedades organolépticas y la calidad de los alimentos y, en el segundo, por la importancia de la emisión de estos compuestos para la calidad del aire, pero también hay otras áreas donde han sido estudiados, tales como en la comunicación entre insectos (feromonas), la comunicación insectos-plantas o incluso el estudio del comportamiento humano, el control de plagas, los aromas, la perfumería, etc.

Sin embargo, el interés por los compuestos volátiles biogénicos como biomarcadores para la detección de enfermedades se ha producido más tarde, iniciándose la investigación sobre ellos posteriormente.

1.1. Biomarcadores

Un biomarcador o marcador biológico es aquella molécula que indica un estado biológico (Muñoz, 2017). El término "biomarcador" fue establecido de manera formal en 1987 por el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (National Research Council) mediante el Comité de Marcadores Biológicos (Kozma, 2010).

Los biomarcadores deben poder medirse objetivamente y están clasificados en tres categorías: pronosticadores, predictivos y farmacodinámicos. Los biomarcadores pronosticadores son capaces de predecir el curso de una patología. Los predictivos, son aquellos que permiten evaluar el posible efecto de un determinado tratamiento. Y, por último, los biomarcadores farmacodinámicos son los que evalúan de forma precisa el efecto de un determinado tratamiento, permitiendo determinar la dosis adecuada de

fármaco en las distintas etapas de la patología (Sawyers, 2008). Para que un compuesto orgánico sea considerado un biomarcador ideal desde el punto de vista de la medición, debe reunir todas y cada una de las siguientes características (Sánchez-Cuellar y Bermúdez, 2012): poder ser determinado de forma no invasiva (o lo menor posible), fácilmente medible y reproducible.

Para que este compuesto sea considerado un biomarcador ideal con relación a su aplicación clínica, debe presentar la mayor parte de las características reunidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de un biomarcador volátil ideal en relación con su aplicación clínica (Sánchez-Cuellar y Bermúdez, 2012).

CARACTERÍSTICAS DE UN MARCADOR IDEAL
1. Indica un proceso clave fisiopatológico en relación con la enfermedad, ya sea como un medidor patógeno o como un epifenómeno
2. Puede ser utilizado para confirmar un diagnóstico o identificar un fenotipo clínico específico
3. Puede ser usado para predecir futuros resultados o efectos adversos
4. Puede ser utilizado para identificar un fenotipo de respuesta al tratamiento
5. Puede demostrar una relación dosis-respuesta y por tanto ser utilizado como guía de tratamiento
6. Ser sensible a cambios en la actividad de la enfermedad mediada por una intervención en el tratamiento
7. Ser sensible en un plazo de tiempo que precede a cambios en el estado clínico y permite una intervención preventiva
8. Ser sensible a cambios en la actividad de la enfermedad

Actualmente, los biomarcadores han adquirido gran relevancia en el campo clínico ya que permiten la detección eficaz y precoz, así como el seguimiento, de distintas enfermedades, como el cáncer, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, etc. Hasta ahora la metodología de análisis se había centrado en la detección y cuantificación de biomarcadores no volátiles y, aunque se han producido grandes avances, hay nuevas líneas de investigación centradas en el descubrimiento de nuevos biomarcadores, como son los biomarcadores volátiles, que pueden ofrecer nueva información o información adicional.

Desde el punto de vista de los analitos a determinar existen, por tanto, dos tipos de biomarcadores relacionados con la detección de estados patológicos, biomarcadores no volátiles y volátiles.

1.2. Biomarcadores no volátiles

Existe una gran cantidad de biomarcadores no volátiles que se utilizan en la detección de diversas patologías, entre ellos son de destacar los que se muestran a continuación.

1.2.1. Biomarcadores en Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por pérdida de memoria, deterioro cognitivo progresivo y trastornos conductuales. Es el tipo de demencia más frecuente, representando hasta el 70%.

El diagnóstico preciso y precoz del Alzheimer es difícil debido a que presenta diversos síntomas en su inicio que son similares a otros trastornos. De esta manera el desarrollo de biomarcadores para la detección precoz de la enfermedad se convierte en un paso crítico para la obtención de una terapia eficaz. Aunque hasta el momento ningún biomarcador está estandarizado para poder ser utilizado en la detección del Alzheimer, hay múltiples investigaciones que centran sus focos en una serie de compuestos que, en ensayos clínicos, permiten augurar una pronta utilización en clínica. Estos son (Kozma, 2010):

- Proteína tau y proteínas derivadas de sinapsis en LCR.
- Proteína β -amiloide en LCR, suero o músculo.
- Proteína precursora de amiloide.
- Apolipoproteínas (A, E) en suero y LCR.

1.2.2. Biomarcadores en enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares, en el mundo occidental, constituyen la primera causa de muerte. El proceso patológico que tiene lugar en estas enfermedades es un engrosamiento de la pared arterial, debido a la formación de placas ateroscleróticas que pueden derivar frecuentemente en complicaciones, provocando trombos, que obstruyen de manera brusca la luz vascular y que pueden dar lugar a su vez al síndrome coronario agudo o a un accidente cardiovascular, que puede llegar a ocasionar la muerte.

Debido a la alta tasa de mortalidad, se hace de gran interés la detección de biomarcadores que diagnostiquen y pronostiquen de manera precoz y eficaz el riesgo de

un individuo de sufrir un evento de esta categoría. El proceso patológico, puede ser identificado mediante moléculas que la pared vascular libera al torrente sanguíneo, de este modo, los biomarcadores cardiovasculares más estudiados dependen del mecanismo implicado en el desarrollo y la rotura de la placa, siendo éstos la disfunción endotelial, la inflamación, el estrés oxidativo, la proteólisis y la trombosis, como se puede apreciar en la Figura 1 (Martín-Ventura et al., 2009).

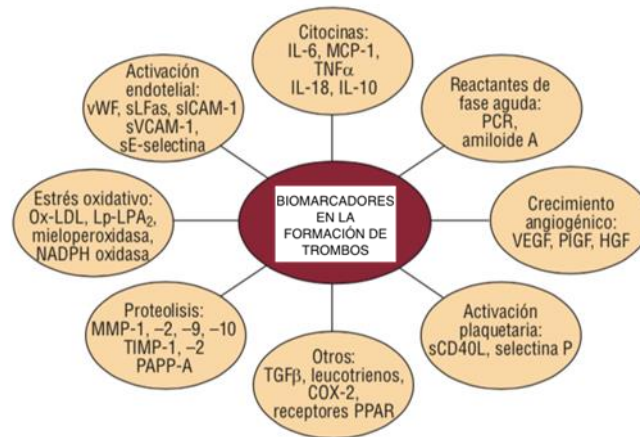


Figura 1. Marcadores circulantes relacionados con la aterosclerosis (Martín-Ventura et al., 2009).

- Disfunción endotelial: el endotelio es dañado principalmente en las zonas donde hay más turbulencia de sangre, principalmente destacan los lípidos, que estimulan la expresión de las moléculas de adhesión y tiene lugar el proceso inflamatorio. La presencia de los biomarcadores ICAM-1, VCAM-1, selectinas E y selectinas P son predictores de eventos cardiovasculares.

- Inflamación: los principales biomarcadores que aparecen en el proceso de inflamación son la quimiocina α , la quimiocina β , la interleucina 6, la quimiocina MCP-1 y la PCR (el biomarcador inflamatorio más conocido).

- Estrés oxidativo: el principal biomarcador en relación con el estrés oxidativo es la fosfolipasa A2 asociado a lipoproteínas (LP-PLA2). Además de ser utilizado en la práctica clínica para la detección y prevención del riesgo producido por esta enfermedad, tiene también mucho interés su uso como diana terapéutica en la enfermedad coronaria.

- Proteólisis: el aumento de las concentraciones de metaloproteinasas (MMP) se ha asociado a la mayoría de los factores de riesgo. Particularmente la MMP-P y el inhibidor TIMP-1, se ven aumentadas en pacientes con aterosclerosis y enfermedad coronaria. Los

trombolíticos y las estatinas son utilizados como principal estrategia terapéutica capaz de modular las concentraciones de MMP.

- Trombosis: además de los datos obtenidos de la PCR, los mejores resultados pertenecen al ligando CD40. Un aumento de la concentración de CD40L soluble predice mayor riesgo de eventos cardiovasculares. En pacientes con síndrome coronario agudo se ha observado por parte de las plaquetas un aumento de la expresión de CD40L (Martín-Ventura et al., 2009).

1.2.3. Biomarcadores en cáncer de próstata

La próstata es un órgano interno del aparato reproductor masculino que se encarga fundamentalmente de la producción de un fluido que es secretado en la uretra y que posteriormente va a formar parte del eyaculado debido a sus propiedades enriquecedoras y protectoras del espermatozoide.

El cáncer de próstata representa la mayor causa de mortalidad en los hombres, cuyos factores de riesgo principales son la edad, la raza y la carga genética. La supervivencia de los pacientes que padecen cáncer de próstata está muy relacionada con el estadio en el que se detecta el tumor, los pacientes que son diagnosticados en su estadio más temprano, sobreviven cerca del 100%, mientras que aquellos en los que se detecta metástasis, cae hasta el 24%, luego se convierte en un requisito fundamental el desarrollo de biomarcadores que detecten de una forma efectiva y precoz la presencia de esta patología.

De manera general, el método más empleado en el manejo de pacientes con cáncer de próstata es la realización de un cribado mediante la determinación del biomarcador PSA (prostate-specific antigen) en suero en varones en torno a la edad de 50 años.

Aunque PSA es un buen predictor del cáncer de próstata en pacientes con niveles elevados, en pacientes con niveles en la zona gris (4-10 ng/mL) presenta una relación pobre y en pacientes con hiperplasia benigna, retención urinaria, prostatitis, etc., por el contrario, pueden producirse valores muy elevados de los niveles de PSA.

De este modo, con el objetivo de mejorar el rendimiento en el diagnóstico del cáncer de próstata, se han desarrollado nuevos biomarcadores emergentes (Montoro, 2019).

En la Figura 2, se puede observar una descripción general de biomarcadores de cáncer de próstata clínicamente validados y emergentes que están aprobados por la FDA

de los Estados Unidos. Estos son biomarcadores presentes en sangre, orina o tejido que tienen un potencial diagnóstico y/o pronóstico predictivo (Saini, 2016).

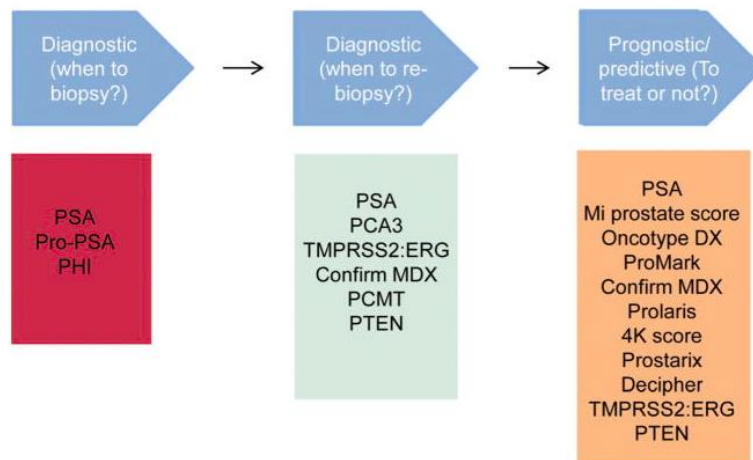


Figura 2. Descripción general de biomarcadores de cáncer de próstata (Saini, 2016).

1.3. Biomarcadores volátiles

Un biomarcador volátil hace referencia a un compuesto orgánico que se encuentra en forma gaseosa, o bien, tiene una alta volatilidad en condiciones normales. Estos compuestos orgánicos volátiles presentes en el aliento exhalado, el sudor, la orina u otras muestras biológicas contienen mucha información sobre el estado de la salud humana. Gracias al desarrollo de diferentes técnicas analíticas, estos compuestos han generado una gran expectativa durante estos últimos años (Muñoz, 2017). Se espera que su papel en el diagnóstico clínico y la monitorización terapéutica sea cada vez más significativo debido a los avances recientes en este campo, avances que podrían permitir realizar el diagnóstico no invasivo de diversas patologías (Amann y Smith, 2013). En este tipo de biomarcadores se centra este Trabajo Fin de Grado.

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este Trabajo Fin de Grado son:

- Estudiar los biomarcadores que se utilizan en la detección de patologías, con especial interés en los biomarcadores volátiles.
- Evaluar la importancia de los biomarcadores volátiles para la detección y diagnóstico precoz de diferentes patologías.
- Recopilar los diferentes métodos analíticos utilizados en la detección y cuantificación de biomarcadores volátiles.
- Realizar una valoración de la evolución temporal de las investigaciones centradas en biomarcadores volátiles.
- Poner de manifiesto diferentes aplicaciones analíticas que se están implementando para la determinación de biomarcadores volátiles que mejoren la detección precoz de enfermedades.

3. METODOLOGÍA

La realización de este trabajo, de carácter bibliográfico, se ha llevado a cabo mediante una búsqueda en catálogos nacionales y bases de datos internacionales, principalmente, con el fin de encontrar libros, documentos técnicos, tesis doctorales o artículos que fueran de interés a la hora de resolver los objetivos marcados en el trabajo.

En primer lugar, se realizaron búsquedas en español en las bases de datos de la Universidad de Sevilla Fama+, que junto con la base de datos también en castellano Google Académico (Google Scholar) y Dialnet, conformaron las bases del trabajo.

Posteriormente, se llevaron a cabo búsquedas bibliográficas en bases de datos internacionales, como PubMed, Scopus, Medline o Science Direct, que resultaron de gran utilidad para valorar la evolución de la investigación sobre los compuestos volátiles como biomarcadores en el diagnóstico de enfermedades.

Las búsquedas, tanto en bases de datos nacionales como internacionales, giraron en torno a una serie de palabras clave, que fueron: volatile biomarkers, diagnosis, non-invasive diagnosis, analysis, determination, VOCs, etc.

Además, para realizar la comparación de artículos publicados que contenían la palabra “biomarcador” se usaron, en primer lugar, términos de búsqueda más generales como volatile organic compound biomarker; y en segundo lugar, se introdujeron otras palabras claves como disease, illness y pathology, filtrando la búsqueda. A su vez se acotó ésta búsqueda a los últimos veinte años (2000-2019).

Para recopilar todos los textos descargados o consultados, y facilitar tanto su citación como la realización de la bibliografía, se usó el gestor de referencias y citas bibliográficas Mendeley.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Compuestos orgánicos volátiles

Los biomarcadores volátiles se encuentran en el amplio y heterogéneo grupo de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) que, de forma general, se definen como aquellas sustancias que presentan presión de vapor alta (temperatura de ebullición baja, menor de 200-250 °C) y pesos moleculares que no superen los 250-300 Da. Son compuestos que pueden tener diferentes grupos funcionales (alcohol, amino, aldehído, etc.) (Stashenko y Martínez, 2011a).

De manera general, los COVs presentan una cadena con un número de carbonos inferior a doce y suelen contener otros elementos como son: oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno. Hay más de un millar de compuestos orgánicos volátiles, pero los más estudiados son aquellos que tienen efecto sobre la salud y el medioambiente (Salinero, 2018). Los efectos y la gravedad de los mismos vienen determinados por las propiedades químicas, como son: volatilidad, liposolubilidad e inflamabilidad.

Los COVs pueden alcanzar la atmósfera a través de diversas fuentes, de bosques (incluyendo explotaciones forestales), océanos o de la degradación bacteriana de la materia orgánica. También pueden tener fuentes de origen antrópico, como disolventes industriales, combustibles, etc. En los últimos años los compuestos más estudiados en el aire han sido: metano, tolueno, n-butano, etano, benceno, n-pentano, propano y etileno (MITECO, 2010).

Sin embargo, aquellos COVs empleados en la práctica clínica son los generados por el cuerpo humano. La mayoría son emitidos por el aire exhalado aunque también se pueden encontrar en la piel, sangre, orina y heces, entre otro tipo de muestras. Es en estos COVs donde surge su importancia, al ser tratados como biomarcadores y ser una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades (Salinero, 2018).

4.1.1. Compuestos volátiles de interés en clínica (Biomarcadores volátiles)

Entre las principales familias de COVs, aquellas que destacan por su relevancia como biomarcadores de patologías son: cetonas, alcoholes, xilenos, hidrocarburos, compuestos heterocíclicos, ácidos orgánicos y terpenos.

Los biomarcadores volátiles están afectados por multitud de parámetros, independientemente de la presencia o no de un proceso patológico. Estas alteraciones se deben a distintas fuentes como son: factores exógenos, toma de muestra, acondicionamiento del analito, factores biológicos y almacenamiento de las muestras.

Algunos biomarcadores, como el amoníaco (NH_3) o el óxido de nitrógeno (NO), pueden ser detectados en el análisis de las muestras, pero no tienen por qué ser un reflejo del estado de salud de la persona. Este tipo de biomarcadores será considerado de origen exógeno y endógeno, a la vez, pues se pueden producir como respuesta a un estado patológico, pero también encontrarse de forma normal en el aire, por lo que no se consideran biomarcadores fiables (Das y Pal, 2020).

Por otro lado, la toma de muestra tiene un carácter fundamental, ya que el analito puede variar su concentración según donde se realice. Cuando el análisis es aplicado al aire exhalado hay una gran diferencia entre la nariz y la boca (Wang et al., 2008), y entre el aire alveolar o el espacio aéreo muerto.

Para el acondicionamiento del analito, es necesario tener en cuenta el punto anterior, la toma de muestra. Los volátiles de interés se encuentran en diversos medios (aire expirado, orina, etc.) y puede ser necesario un tratamiento previo, como, por ejemplo, la disolución del analito en otro disolvente (Das y Pal, 2020).

En el análisis de biomarcadores volátiles es imprescindible un correcto almacenamiento de la muestra. Unas condiciones inadecuadas generan pérdidas de los compuestos de interés, y por ende un resultado erróneo (Das y Pal, 2020).

Por último, los factores biológicos de mayor relevancia son la edad, género, alimentación y embarazo. Algunos biomarcadores volátiles, como el isopreno, pueden variar a lo largo del crecimiento, alcanzando su máximo en la pubertad (Taucher et al., 1997; Smith et al., 2010), encontrándose más concentración en hombres que en mujeres (Lechner et al., 2006).

El avance en las técnicas de análisis de compuestos volátiles como la nariz electrónica, reacción de transferencia de protones acoplado a espectrometría de masas (PTR-MS) y, sobre todo, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) han supuesto un enorme avance en la detección y determinación de biomarcadores volátiles.

4.2. Biomarcadores volátiles en patologías

4.2.1. Biomarcadores en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una patología respiratoria en la que aparece una limitación del flujo aéreo crónico y progresivo. Los síntomas más característicos de esta enfermedad son la tos y la disnea.

Sin lugar a duda, el humo del tabaco es el factor de riesgo más importante en el desarrollo de la EPOC, demostrándose además que este riesgo aumenta proporcionalmente al número de cigarrillos consumidos.

Según el estudio realizado por SEPAR (Sociedad Española De Neumología y Cirugía Torácica): "En la población no fumadora, el 7,6% de los hombres y el 5,5% de las mujeres padecen EPOC en España, cifra que se eleva hasta el 39,9% de los hombres y al 15,4% de las mujeres que han fumado más de 10 años".

El humo del tabaco está formado por más de 2000 compuestos, radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, esto genera un estrés oxidativo y una inflamación en las vías respiratorias que da lugar a la peroxidación lipídica. El daño que genera esta reacción produce compuestos orgánicos volátiles, que son identificados en el aire exhalado como biomarcadores de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad.

Los COVs que principalmente resultan de importancia a la hora de ser usados como biomarcadores, son aquellos que no provienen del humo del tabaco ni los hidrocarburos ramificados.

Tras un estudio realizado con 5 COV de importancia (hexanal, heptanal, nonanal, ácido propanoico y ácido nonanoico) se obtuvieron los siguientes datos recogidos en la Figura 3, en la que se observan los COV cuantificados en pacientes detectados y no detectados con la enfermedad (Jareño-Esteban et al., 2017).

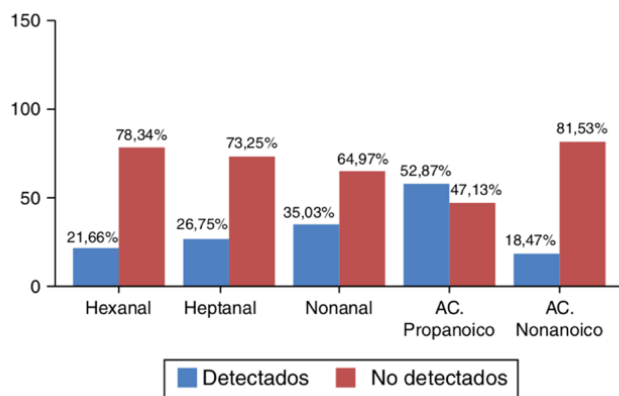


Figura 3. Distribución de frecuencias de detección de los COVs estudiados (Jareño-Esteban et al., 2017).

4.2.2. Biomarcadores volátiles en el cáncer

- Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es un tumor maligno no cutáneo originado por la multiplicación incontrolada de células. Representa el tumor más diagnosticado en hombres, cuyos factores de riesgo principales son la edad, la raza y la carga genética. La supervivencia de los pacientes que padecen cáncer de próstata está muy relacionada con el estadio en el que se detecta el tumor (Salinero, 2018).

Los estudios realizados en la orina de pacientes sanos frente a pacientes con cáncer de próstata demuestran que, en pacientes que padecen esta enfermedad, los niveles de determinados COVs como 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, 3-octanona y 2-octanona son inferiores, mientras que los niveles de p-xileno son significativamente superiores.

- Cáncer de mama

El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres de todo el mundo y una de las principales causas de muerte. Cada año, más de 1.3 millones de mujeres son diagnosticadas y, aproximadamente, 0.5 millones fallecen a causa de esta enfermedad.

Debido a los recientes avances en química analítica, la asociación entre cáncer y COVs en el aire exhalado ha atraído el interés de los investigadores.

Se ha detectado que la presencia de 2,5,6-trimetiloctano, 1,4-dimetoxi-2,3-butanodiol y ciclohexanona distingue entre pacientes sanos y pacientes con cáncer de mama (Wang et al., 2014).

- Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una de las enfermedades más comunes del siglo XXI. Es la principal causa de muerte entre hombres y mujeres en los Estados Unidos, asociada sin duda al consumo de cigarrillos.

Existen muchos tipos de cáncer de pulmón y su gravedad varía según el estadio en el que se encuentre en el momento del diagnóstico, de esta manera se hace de vital importancia la detección precoz mediante el uso de biomarcadores volátiles.

Se ha encontrado que los COVs 2-butanona, 1-butanol y algunos aldehídos estaban presentes en concentraciones superiores en pacientes que padecen la enfermedad (Ghosh et al., 2020).

- Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es aquel que tiene lugar en las células del colon o del recto. Este tumor es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo y sin duda su detección precoz se hace de vital importancia para reducirlas.

De forma general, los estudios realizados consistieron en detectar la presencia de COVs en las heces. De esta manera, el 2-propanol, la 2-hexanona y el 3-metil butanoato de etilo fueron identificados con unos niveles significativamente superiores en pacientes con la patología (Bond et al., 2019).

4.2.3. Biomarcadores volátiles en la enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica recurrente del tracto gastrointestinal que cursa con colitis ulcerosa conocida como enfermedad inflamatoria intestinal. La inflamación crónica de la mucosa conduce a un daño intestinal irreversible con complicaciones como la estenosis o la fístula.

Debido al alto número de pacientes que padecen estas complicaciones se hace imprescindible una adecuada monitorización clínica de la inflamación de la mucosa para optimizar las estrategias terapéuticas, y de este modo detectar biomarcadores que sean liberados por las paredes de la mucosa intestinal que ayuden a diagnosticar de una manera precoz la presencia de la enfermedad.

Recientes estudios muestran que aparecen una serie de COVs, como son 2,2,4-trimetilpentano, heptadecano, y 1-butoxi-2-propanol que parecen indicar la presencia de la enfermedad (Bodelier et al., 2015).

4.2.4. Biomarcadores volátiles en la enfermedad hepática crónica

Esta enfermedad se caracteriza por la dificultad del hígado para realizar de manera correcta sus funciones y actualmente se encuentra en constante crecimiento, afectando a un gran porcentaje de la población mundial y llegando a provocar la muerte cuando se producen determinadas complicaciones.

Mediante diferentes pruebas, estudios e investigaciones se determinó que la presencia de unos valores de isopreno por encima de 29 ppb determinaban la presencia avanzada de fibrosis, una de las principales manifestaciones de la enfermedad hepática (Alkhouri et al., 2015).

4.3. Metodología analítica

Generalmente, los métodos analíticos utilizados para la evaluación de compuestos volátiles incluyen todos los pasos del proceso analítico general; como muestreo, preparación de muestra, separación, identificación, cuantificación y análisis de datos. Antes de abordar el análisis de COVs deben tenerse en cuenta tres puntos que van a caracterizar a estos biomarcadores volátiles (Morales et al., 2013).

- La concentración de COVs es normalmente baja, por lo que debido a esto solo se obtendrá una pequeña cantidad aunque la muestra sea grande.

- La fracción volátil presenta diversos compuestos con diferentes masas moleculares y distinta naturaleza química, y sus concentraciones pueden variar considerablemente.

- La formación de artefactos debe ser evitada durante el análisis, previniendo así que interfieran y produzcan resultados incorrectos.

La estrategia para aislar COVs va a depender fundamentalmente de tres parámetros: el tipo de matriz donde se encuentran (homogeneidad, composición...), la naturaleza química y la concentración en la mezcla.

Distintos métodos de aislamientos pueden llevar a la obtención de diferentes composiciones, de este modo, frecuentemente, se usan varias técnicas de extracción, para

así, poder obtener una completa composición de la mezcla de volátiles aislada (Stashenko y Martínez, 2011a).

4.3.1. Toma de muestra

Para realizar la recogida de aire exhalado se hace necesario el empleo de medios herméticos y fáciles de transportar, debido a la distancia que existe entre el lugar donde es recogida la muestra y donde va a ser analizada. Además, no debe suponer un problema o inconveniente para el paciente, ya que estos suelen presentar problemas respiratorios. Debido a esto, el medio elegido para la toma de muestras suelen ser bolsas Tedlar (Figura 4), que por sus características constituyen uno de los medios más apropiados para el almacenamiento de COVs.

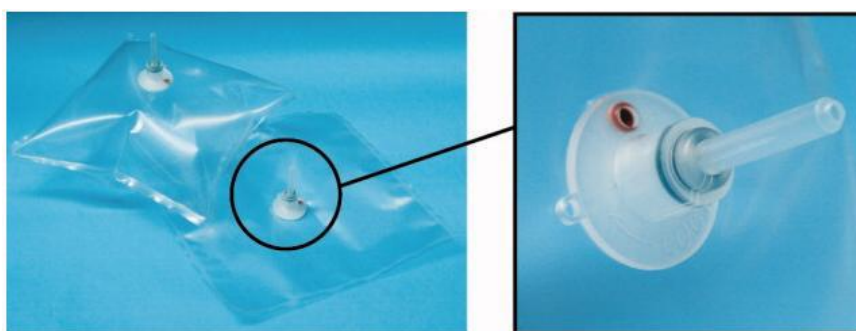


Figura 4. Bolsa Tedlar.

Tedlar es la marca comercial del fluoruro de polivinilo, un polímero que aumenta la resistencia y la durabilidad debido a que posee flúor, que produce una mejor unión química, es inerte a la mayoría de los compuestos y además puede ser utilizada entre -72 °C y 107 °C.

Las bolsas Tedlar presentan un fácil manejo ya que disponen de una válvula y un septum. La válvula se bloquea y desbloquea con un simple giro, permitiendo o no la entrada del aire exhalado por el paciente en el interior de la bolsa. La función del septum es permitir la entrada posterior de la fibra de microextracción en fase sólida manteniendo la bolsa cerrada y evitando así la contaminación de la muestra. Presentan también, por motivos higiénicos, unas boquillas desechables para cada paciente.

El aire exhalado, preferiblemente, es recogido en ayunas, consiguiendo así, evitar la presencia de compuestos procedentes de alimentos ingeridos. Además, es

recomendable realizarla en un lugar libre de sustancias químicas que puedan interferir en el llenado de las bolsas (Vilches, 2010).

4.3.2. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra antes del análisis de los compuestos orgánicos volátiles está formada principalmente por dos etapas, el aislamiento y la preconcentración de la fracción volátil.

Se pueden identificar dos tipos de procedimientos de preparación de muestra, los que no requieren un proceso de preconcentración, y los que sin embargo, si involucran un proceso de preconcentración (Tabla 2) (Morales et al., 2013).

Tabla 2. Preparación de la muestra (Morales et al., 2013).

Preparación de la Muestra	
No implican preconcentración	Inyección directa (DI)
	Espacio de cabeza estático (SHS)
Implican preconcentración	Destilación-extracción (SDE)
	Espacio de cabeza con SPME (HS-SPME)
	Extracción con fluidos supercríticos (SFE)
	Extracción absorptiva en espacio de cabeza (HSSE)

4.3.2.1. Procedimientos que no requieren de preconcentración

- Inyección Directa: es la técnica más sencilla y la que requiere la menor manipulación de la muestra, sin embargo, tiene las desventajas de ser la menos sensible y de necesitar elevadas temperaturas. Consiste en colocar una pequeña cantidad de muestra a la entrada del inyector del cromatógrafo en un soporte (lana de vidrio), seguidamente se realiza un aumento de la temperatura, de manera que se purga y se produce una extracción de los COVs que son arrastrados por el gas hasta la columna cromatográfica. Es necesario realizar una buena limpieza entre las diferentes muestras, evitando así la aparición de resultados erróneos debido a la presencia de restos de muestras anteriores (Morales et al., 2013).

- Espaciado de cabeza estático (SHS): es una forma sencilla que consiste en analizar la fracción volátil de una alícuota de la fase de vapor que se encuentre en equilibrio con la muestra. Para ello se coloca en un vial sellado y se aumenta la temperatura durante cierto tiempo. En este método es de vital importancia el control exhaustivo de la temperatura y de la recogida de muestra, ya que aunque las concentraciones de los volátiles no varíen, pueden dispersarse al recogerse la muestra de la alícuota gaseosa.

Esta técnica presenta una serie de desventajas, como son la falta de sensibilidad y la acumulación de agua en el espacio de cabeza, por lo que no se recomienda para algunas muestras (trazas o compuestos con baja presión de vapor). Normalmente la muestra se inyecta con jeringa, ya que esta técnica evita que se introduzcan sustancias extrañas, se reducen los cambios por reacciones químicas y además se minimizan las pérdidas de sustancias volátiles (Morales et al., 2013). En la Figura 5 se pueden apreciar las dos técnicas anteriormente explicadas.

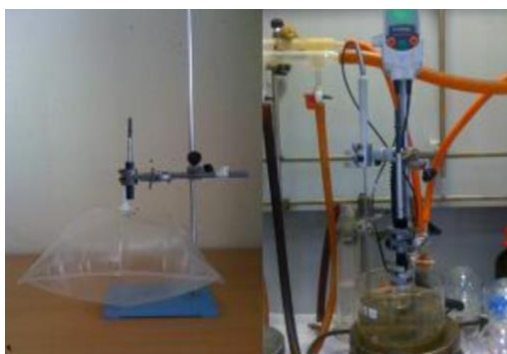


Figura 5. Inyección directa vs espacio de cabeza (Vilches, 2010).

4.3.2.2. Procedimientos que requieren de preconcentración

La mayoría de las técnicas más empleadas en el análisis de COVs requieren un enriquecimiento o preconcentración, ya que estos compuestos se encuentran en baja concentración.

- Destilación-Extracción simultánea (SDE): las técnicas de destilación están basadas en las diferencias de las propiedades fisicoquímicas de los analitos a aislar y de la matriz, concretamente de sus temperaturas de ebullición.

La destilación, puede llevarse a cabo de diversos modos, como; el arrastre con vapor (SD), la hidrodestilación (HD) o la destilación con agua-vapor (Figura 6) (Stashenko y Martínez, 2011b).

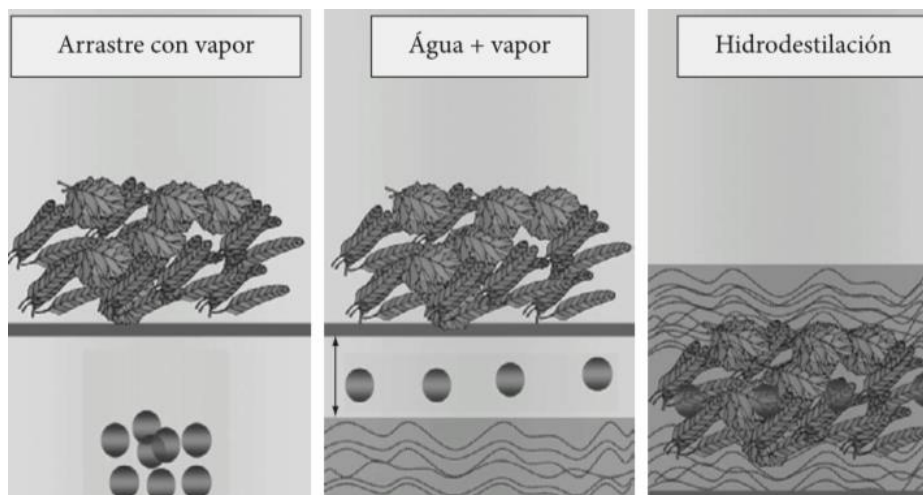


Figura 6. Métodos de destilación (Stashenko y Martínez, 2011b).

De manera general, el vapor procedente de la destilación es condensado en un refrigerante e inyectado en el cromatógrafo, que suele necesitar una previa concentración. Esta concentración se realiza mediante la extracción (mediante un disolvente adecuado), de ahí que surja la técnica de destilación-extracción simultánea, cuyos principios se basan en la destilación por separado de la muestra disuelta en agua y del disolvente y la posterior condensación en la misma zona, produciéndose la extracción. Este método presenta inconvenientes, debido a que no puede ser usado con volátiles termolábiles (Morales et al., 2013).

- Espacio de cabeza dinámico (DHS): el objetivo de esta técnica es determinar gases que se encuentran disueltos en muestras líquidas. La principal diferencia frente al espacio de cabeza estático es que presenta un flujo continuo de gas sobre la muestra de COVs. Esta técnica se basa en el arrastre de los volátiles de la muestra, a una determinada temperatura y mediante un gas inerte con un flujo controlado. Estos volátiles arrastrados terminan en una trampa donde quedan retenidos, y de donde más tarde van a ser desorbidos e inyectados en el cromatógrafo para su separación (Figura 7).

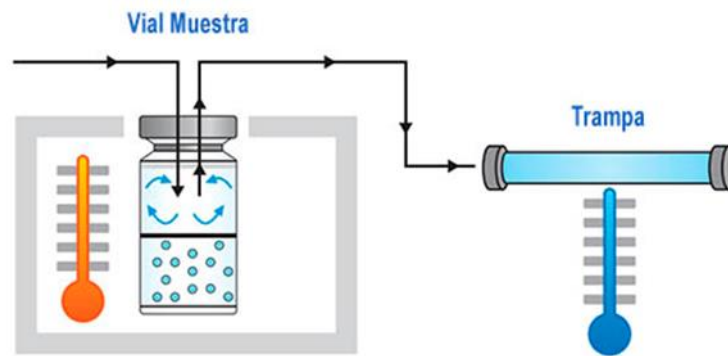


Figura 7. Esquema del proceso de extracción en espacio de cabeza dinámico
(Chromlab, 2020).

La temperatura, el tiempo y el flujo de arrastre van a ser las principales variables que van a determinar un arrastre correcto, ya que unos valores demasiado bajos pueden dar lugar a un arrastre defectuoso, y unos valores demasiados altos a la pérdida de volátiles.

- Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME): es una alternativa al espacio de cabeza dinámico que engloba el aislamiento y la preconcentración en un solo paso. Se realiza mediante fibras de extracción, que pueden tener diversas composiciones (i.e. polidimetilsiloxano/divinilbenceno o carbowax/divinilbenceno). A la muestra, una vez que ha sido agitada y calentada, hasta la temperatura indicada, se le insertan las fibras en el espacio de cabeza manteniéndose la temperatura y agitación (mantener equilibrio), de esta manera estas fibras van a adsorber los volátiles de la muestra (Figura 8). Una vez terminado el proceso, la fibra con los COVs adsorbidos es inyectada en un cromatógrafo de gases (González-Zúñiga et al., 2011).

Esta técnica supuso un gran avance, debido a que es simple, fácilmente compatible con técnicas de separación y con buena respuesta a muchos analitos, proporcionando resultados de gran fiabilidad. Por el contrario, presenta algún inconveniente, como son la fragilidad de las fibras empleadas, o la vida útil de las mismas (Cacho, 2017).

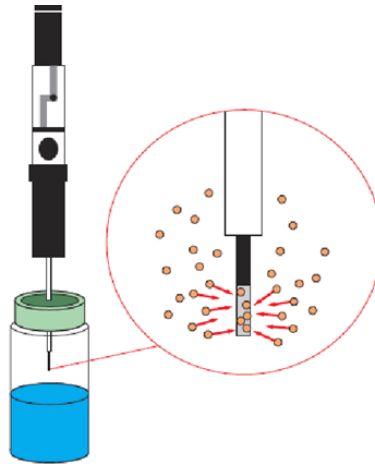


Figura 8. Dispositivo de microextracción en fase sólida (Schmidt y Podmore, 2015).

- Extracción de fluidos supercríticos (SFE): un fluido supercrítico es un fluido que se encuentra a una temperatura y presión por encima del punto crítico. Cuando la temperatura está por encima de la crítica, no se puede generar la fase líquida condensada al aumentar la presión. Un fluido supercrítico, si a presión constante se reduce la temperatura pasa directamente a gas, y si se mantiene la temperatura constante y se reduce la presión pasa directamente a gas. En este punto el compuesto es compresible, comportándose como un gas y tiene la densidad de un líquido y por lo tanto su poder disolvente (Luque de Castro et al., 1993).

Esta técnica tiene lugar como se muestra en la Figura 9. La muestra se coloca en la zona de extracción, se bombea CO₂ a baja temperatura y cuando éste llega al separador se calienta hasta la temperatura indicada. La mezcla CO₂-muestra se descomprime y el CO₂ recircula, obteniéndose el producto (Sotelo y Ovejero, 2003).

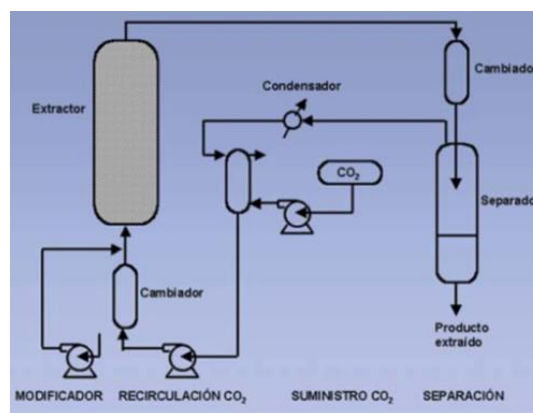


Figura 9. Esquema de una instalación para la extracción con fluido supercrítico (Sotelo y Ovejero, 2003).

- Extracción por absorción en espacio de cabeza (HSSE o Twister): Esta técnica es empleada para la extracción de analitos que se caractericen por su elevada volatilidad. Está basada en la absorción de los compuestos volátiles sobre un polímero que recubre una barra agitadora.

En este método, el dispositivo de extracción (Figura 10) no es sumergido en la muestra, sino que se coloca y mantiene sobre la fracción gaseosa de la muestra que se encuentra en el vial (Cacho, 2017).

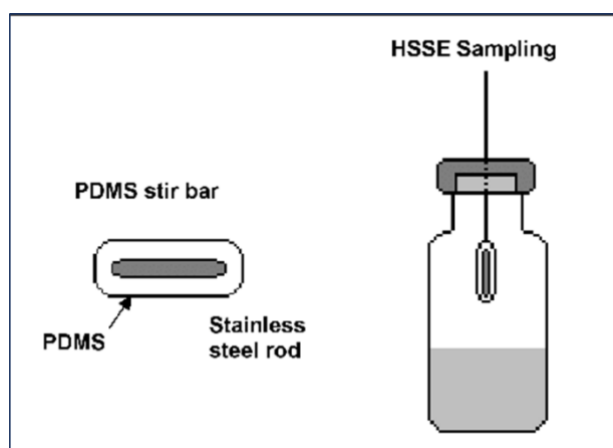


Figura 10. Extracción en espacio de cabeza utilizando barra agitadora (Bicchi et al., 2004).

4.3.3. Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas más utilizadas en la detección y determinación de biomarcadores volátiles son: Nariz Electrónica, Reacción de Transferencia de Protones y Espectrometría de Masa (PTR-MS), Tubo de flujo de iones y Espectrometría de Masas (SIFT-MS), Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (GC-MS) y Volatolómica.

4.3.3.1. Nariz electrónica

La nariz electrónica es un sistema compuesto por una matriz de sensores con capacidad analítica, cuyo objetivo es detectar COVs. Los analitos se adsorben en los sensores, donde se encuentra el sistema de detección, que detectan un cambio en la conductividad, el color o la oscilación de un cristal (Figura 11). La nariz electrónica responde solo a una mezcla de compuestos de la muestra, y el sistema de reconocimiento de patrones interpreta y detecta los altos niveles de COVs que causan la patología. Los

inconvenientes que presenta esta técnica analítica incluyen la amplia preparación de las muestras, la falta de datos cuantitativos y la calibración (Fernandes et al., 2015).



Figura 11. Trabajo de una nariz electrónica (Fernandes et al., 2015).

4.3.3.2. Reacción de transferencia de protones-Espectrometría de masas (PTR-MS)

La reacción de transferencia de protones es una técnica de análisis químico que utiliza iones reactivos de hidronio H_3O^+ en fase gaseosa como reactivo. Utilizando esta técnica la concentración absoluta de los COVs puede medirse sin calibración y con límites de detección de ppt en el aire exhalado. Es una técnica analítica en tiempo real altamente sensible para la detección de COVs en el aire. En la Figura 12 se muestra un diagrama de bloques PTR-MS (Das y Pal, 2020).

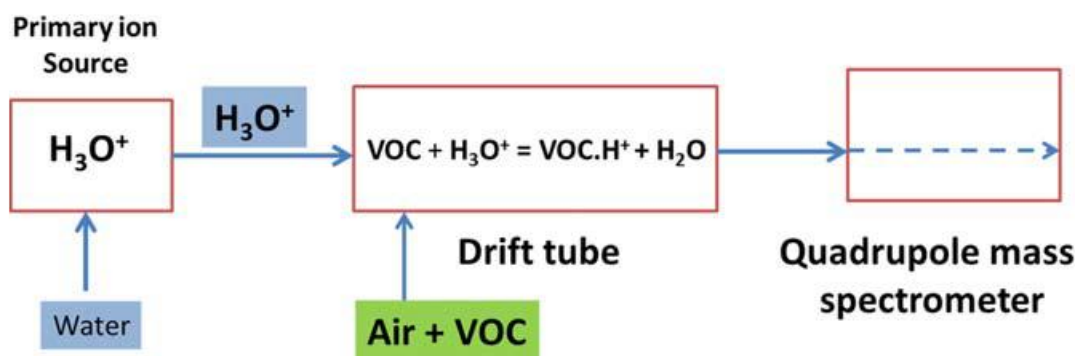


Figura 12. Diagrama de bloques PTR-MS (Das y Pal, 2020).

La PTR-MS combina la ionización química a través de reacciones de transferencia de protones de H_3O^+ y la formación cuantitativa de iones de producto en un tubo de

corriente (Mikoviny et al., 2010). En la Figura 13 se muestra un esquema de PTR-MS (Peinado et al., 2018).

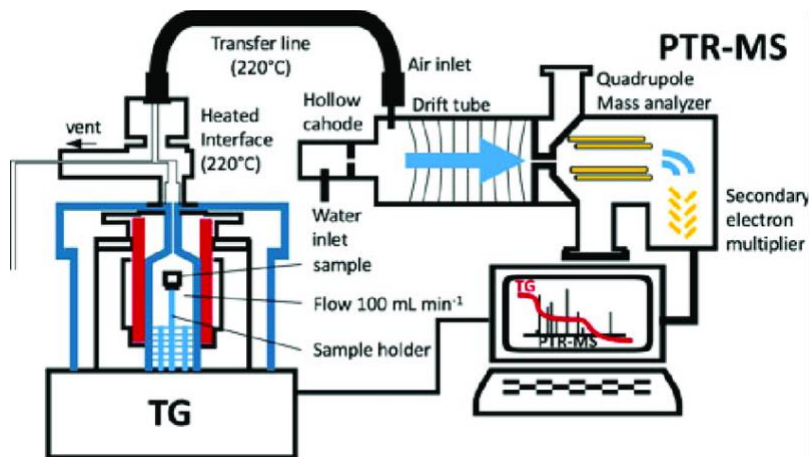


Figura 13. Esquema PTR-MS (Peinado et al., 2018)

4.3.3.3. Tubo de flujo de iones-Espectrometría de masas (SIFT-MS)

Técnica analítica para la detección cuantitativa de trazas de COVs. Iones reactivos como H_3O^+ , NO^+ , O_2^+ , ionizan la muestra para su posterior cuantificación por espectrometría de masas de cuadrupolo. En la Figura 14 se muestra un diagrama de bloques SIFT-MS (Das y Pal, 2020).

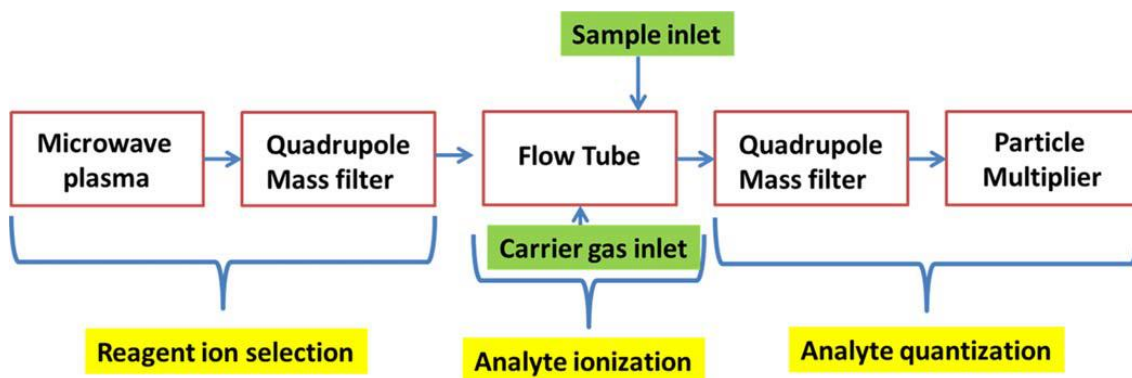


Figura 14. Diagrama de bloques SIFT-MS (Das y Pal, 2020).

La espectrometría de masas de tubos de flujo de iones es un tipo especial de espectrometría de masas directa que analiza COVs. SIFT-MS combina una ionización química muy suave y controlada con precisión, junto con la detección espectrométrica de masas. Todo esto se debe al flujo de los iones H_3O^+ , NO^+ y O_2^+ , que permiten identificar un amplio número de compuestos (Smith et al., 2010).

4.3.3.4. Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS)

La GC-MS (Figura 15) es una técnica acoplada que une el poder de separación de la cromatografía de gases y el de identificación de la espectrometría de masas. Comienza con la inyección de la muestra, es importante que la cantidad de analitos que entra en una columna GC sea suficiente y comparable con los niveles mínimos de detección, cuantificación e identificación. La temperatura del puerto de inyección debe ser lo suficientemente alta para conseguir evaporar todos los compuestos de la mezcla que, mediante una columna capilar rellena con una fase estacionaria adecuada, consigue la separación de los analitos de la muestra, de forma que a medida que se van separando van eluyendo la columna.

Una vez que todos los compuestos han abandonado la columna cromatográfica, son ionizados mediante el espectrómetro de masas y se procede a su detección. En muchos extractos de COVs pueden aparecer diferentes familias de sustancias, para ello, la combinación de sistemas de detección selectivos como NPD y FPD con el detector de masas ayuda a la identificación química de la mezcla (Stashenko y Martínez, 2011a).

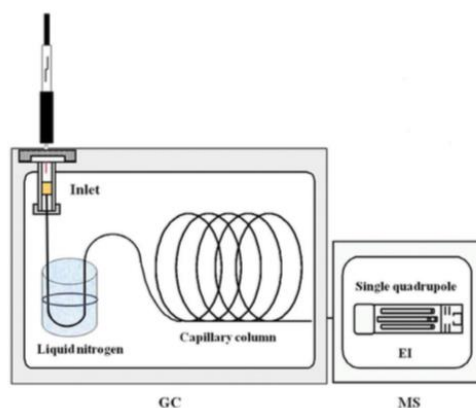


Figura 15. Diagrama esquemático de GC-MS (Ghosh et al., 2020).

4.3.3.5. Espectrometría de movilidad iónica-Espectrometría de masas (IMS-MS)

La espectrometría de movilidad iónica (IMS) es una técnica analítica que consiste en una fuente ionizante que produce la rotura de las moléculas de los COVs en iones en la fase gaseosa.

El proceso de detección de IMS (Figura 16) se basa en el movimiento de iones en una corriente de gas, a presión atmosférica, bajo la influencia de un campo eléctrico estable ($100\text{-}350\text{ Vcm}^{-1}$) dirigido hacia una placa Faraday, generando de esta manera una señal eléctrica de acuerdo con su forma y tamaño (Fernandes et al., 2015).

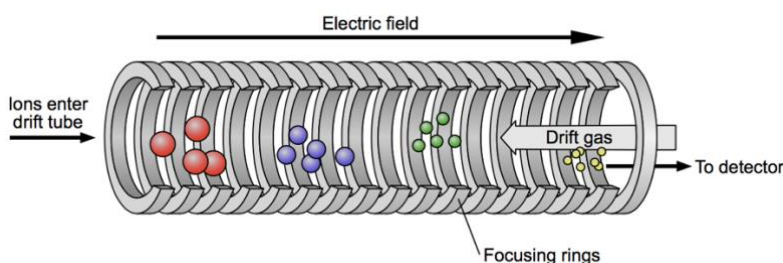


Figura 16. Diagrama IMS (Dahl, 2009).

El acoplamiento de IMS con MS extiende enormemente las capacidades y aplicaciones de la técnica. IMS-MS es extremadamente útil para obtener información estructural sobre pequeños iones poliatómicos e iones macromoleculares, como proteínas e incluso virus.

4.3.3.6. Volatolómica

La metabolómica volátil (volatolómica) puede tener una amplia gama de aplicaciones, aunque sin duda el enfoque principal tiene lugar en los COVs.

La volatolómica es un método de diagnóstico de COVs no invasivo introducido recientemente, basado fundamentalmente en el uso del olfato. El volatoloma humano presenta una matriz de compuestos que constituyen el olor del cuerpo humano, que pueden aportar información diagnóstica. Cuando ocurren anomalías o cambios (relacionado con enfermedades), los productos metabólicos volátiles se ven alterados y/o se generan nuevos COVs de manera que pueden ser utilizados para identificar patologías de manera eficaz y no invasiva (Giannoukos et al., 2019).

4.3.4. Evolución temporal y aplicaciones de interés en distintas patologías

El uso de la palabra biomarcador, desde que fue establecida en 1987, ha ido aumentando a lo largo del tiempo, debido, entre otros motivos, a la evolución de las técnicas de análisis que han ido permitiendo su determinación.

Con el fin de estudiar la evolución temporal del uso de biomarcadores volátiles asociados a patologías, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en los últimos 20 años, realizando la búsqueda en la base de datos Scopus.

Las Figuras 17 y 18 muestran con un diagrama de barras el número de artículos publicados cada año. Como se puede apreciar en ambas figuras, el número de publicaciones ha ido aumentando de manera considerable en las últimas dos décadas, siendo notable el aumento producido en la última de ellas.

La Figura 17 muestra los resultados de la búsqueda realizada con términos más generales, tales como *volatile organic compound* y *biomarker*, mientras que la Figura 18 muestra la llevada a cabo con términos de búsqueda más específicos, tales como *volatile organic compound, biomarker, disease, pathology e illness*. Se puede observar que la cantidad de publicaciones en la Figura 17 es mayor que en la Figura 18 debido al filtro de búsqueda aplicado. El número más alto de publicaciones se encuentra en el último año y se aproxima a 190 en el primer caso, mientras que en el segundo se encuentra alrededor de 130.

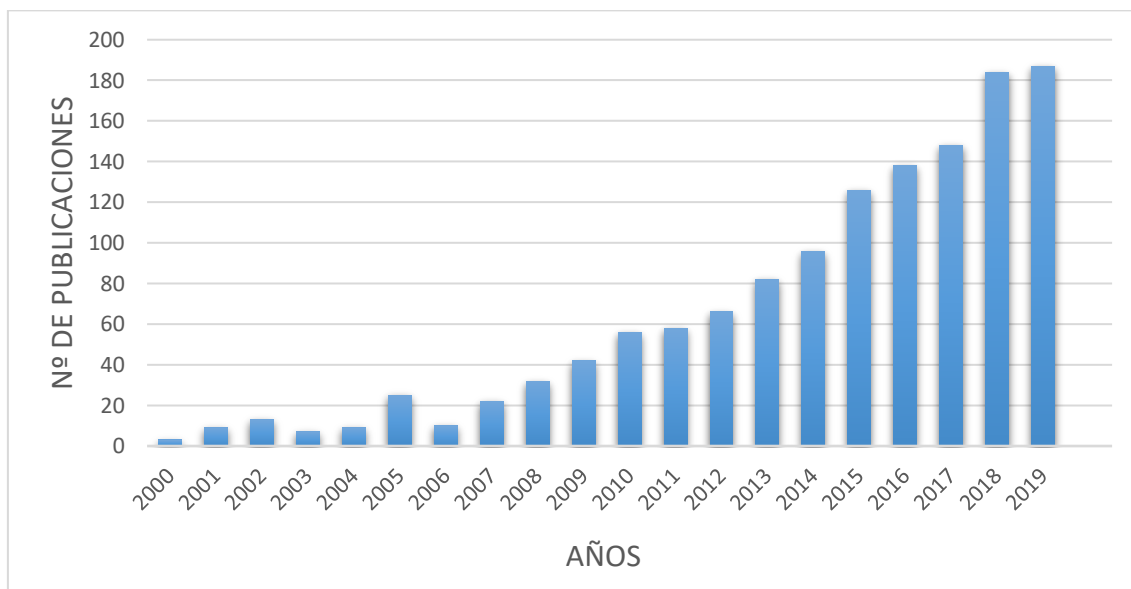


Figura 17. Número de publicaciones con términos de búsqueda generales (*volatile organic compound* y *biomarker*) entre los años 2000 y 2019.

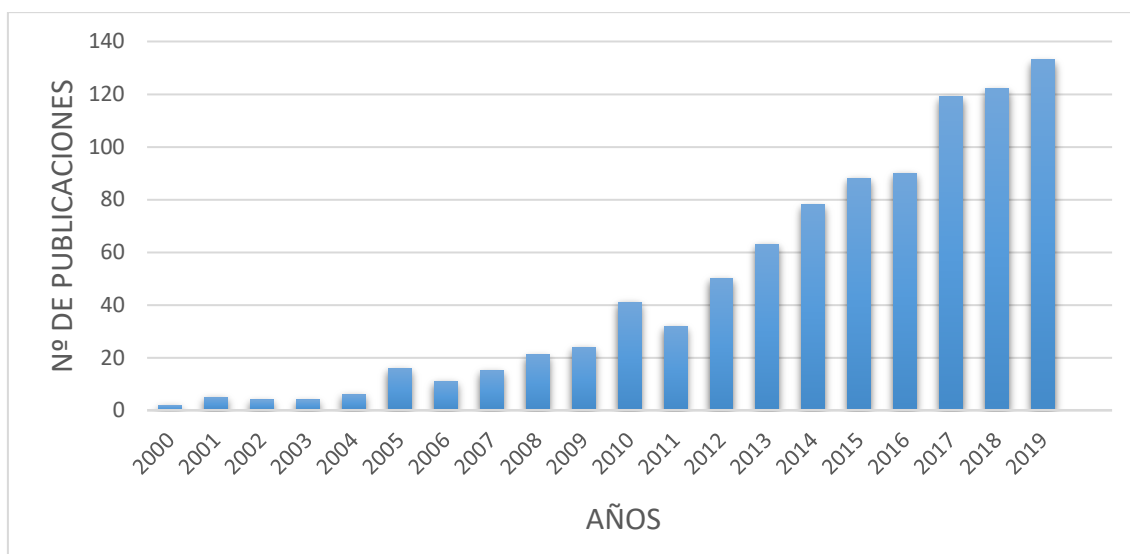


Figura 18. Número de publicaciones con términos de búsqueda más específicos (*volatile organic compound, biomarker, disease, pathology e illness*) entre los años 2000 y 2019.

Se puede observar que desde el año 2000 al 2007 hay un ligero incremento en el número de publicaciones en ambas gráficas. En la Figura 17, desde el 2008 hasta 2017 hay un incremento lineal, habiendo un aumento significativo entre el 2017 y el 2018, y manteniéndose entre 2018 y 2019 un número aproximadamente igual de publicaciones. Sin embargo, en la Figura 18, este salto significativo se produce un año antes, en el 2017, observándose otro pequeño salto entre 2018 y 2019.

Por último, con el fin de evaluar los procedimientos analíticos más utilizados para llevar a cabo la detección de distintas patologías mediante la utilización de biomarcadores volátiles, se han recogido algunos de los artículos encontrados en los últimos 10 años y se han recopilado en una tabla considerando el tipo de muestras que se analizaban, el procedimiento de preparación de muestra utilizado, la técnica analítica usada para su determinación y la patología de aplicación. En Tabla 3 se encuentran los resultados obtenidos.

Se puede observar que el tipo de muestra más frecuente es el aire exhalado, los biomarcadores volátiles utilizados son compuestos de distinto tipo dependiendo de las patologías, el procedimiento de preparación de muestra más frecuente es SPME en espacio de cabeza, la técnica analítica más empleada es GC-MS y las aplicaciones más frecuentes están relacionadas con enfermedades cancerígenas.

Tabla 3. Aplicaciones del proceso analítico a la detección de biomarcadores en distintas patologías.

Muestra	Biomarcador volátil	Preparación muestra	Técnica instrumental	Aplicación	Referencias
Aire exhalado	2-metilpentano/ 4-metiloctano	DHS Tubos de vidrio /Desorción térmica	GC-MS	Cáncer de pulmón	Filipiak et al., 2010
Orina	4-heptanona/ metanotiol	HS-SPME	GC-MS	Leucemia, cáncer colorrectal y linfomas	Silva et al., 2011
Aire exhalado	Reconocimiento de patrones	---	Nariz electrónica	Mesotelioma maligno	Chapman et al., 2012
Sangre	1,1,4,4-tetrametil-2,5-dimetilenciclohexano	HS-SPME	GC-MS	Cáncer colorrectal	Wang et al., 2014a
Aire exhalado	2,5,6-trimetiloctano/ 1,4-dimetoxi-2,3-butanodiol/ ciclohexanona	HS-SPME	GC-MS	Cáncer de mama	Wang et al., 2014b
Aire exhalado	2,2,4-trimetilpentano/ heptadecano/ 1-butoxi-2-propanol	DHS Trampa carbono /Desorción térmica	GC-TOF-MS	Enfermedad de Chron	Bodelier et al., 2015
Aire exhalado	21 COVs	---	GC-MS/ Volatolómica	Cáncer de mama	Barash et al., 2015
Aire exhalado	Isopreno	Bolsa Mylar	SIFT-MS	Enfermedad hepática crónica	Alkhoury et al., 2015
Aire exhalado	2-butanona/ 3-hidroxi-2-butanona/ 2-hidroxiacetaldehído/ 4-hidroxihexanal	Microchip de silicio/sal de amonio cuaternario	MS	Cáncer de pulmón	Schumer et al., 2015
Aire exhalado	α -felandreno/ estireno/ 4-metildodecano	DHS Trampa Tenax/Desorción térmica	GC-MS/Nariz electrónica	Cáncer de pulmón	Nardi-Agmon et al., 2016
Aire exhalado	1-octeno/ 1-deceno/ 2-noneno	Bolsa Tedlar	IMS-MS	Enfermedad inflamatoria intestinal	Arasaradnam et al., 2016

Aire exhalado	3-heptanona/ CO ₂	Trampa fría/Desorción térmica	GC-MS/ PTR-MS/ SIFT-MS	Enfermedad pulmonar	Horváth et al., 2017
Aire exhalado	Ácido nonanoico	Cámara BioVoc /Desorción térmica	GC-MS	Cáncer de pulmón	Muñoz, 2017
Aire exhalado	Dodecano/ heneicosano/ decanal/ nonanal/ 2- etilidodecanal	HS-SPME	GC-MS/Nariz electrónica	Enfermedad pulmonar	Thriumani et al., 2018
Orina	p-xileno	HS-SPME	GC-MS	Cáncer de próstata	Salinero, 2018
Heces	2-propanol/ 2- hexanona/ 3- metil butanoato de etilo	HS-SPME	GC-MS	Cáncer colorrectal	Bond et al., 2019
Aire exhalado	Aldehído/2- butanona/1- butanol	HS-SPME	GC-MS	Cáncer de pulmón	Ghosh et al., 2020

6. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo de revisión bibliográfica acerca de los biomarcadores volátiles y de su aplicación en clínica, se ha podido observar el potencial de estos compuestos orgánicos en la detección de estados patológicos de una manera prematura, evitando el avance de ciertas enfermedades en las que el estadio en las que se diagnostica es de vital importancia para la cura de las mismas. A su vez, al ser un método de diagnóstico no invasivo, es muy bien tolerado por la mayoría de los pacientes, facilitando aún más su análisis.

De este modo, se contempla cómo a lo largo de las últimas dos décadas el interés por estos COVs ha ido en aumento, viéndose reflejado en un crecimiento exponencial en el número de publicaciones científicas, y por lo tanto de investigaciones acerca de estos compuestos, lo que ha ido dando lugar a la aparición de nuevos métodos y técnicas analíticas que facilitan su determinación, como son la microextracción en fase sólida, la nariz electrónica, la reacción de transferencia de protones, el tubo de flujo de iones o la cromatografía de gases acopladas a espectrometría de masas, entre otras.

Sin embargo, por muchos avances que se hayan realizado en este campo, no cabe duda de que el mundo de los COVs y su uso en clínica están en pleno desarrollo y crecimiento y aún no se han alcanzado una exactitud y precisión suficientes, en la mayoría de los casos, que les permita ser usados como único método de detección.

Con los avances que se consigan en su investigación, en años venideros, será posible diagnosticar enfermedades desde su inicio, con total fiabilidad y autonomía, mediante una simple exhalación y el posterior análisis de estos compuestos orgánicos volátiles, aumentando así la calidad de vida de los pacientes y haciendo más fácil el día a día de los sanitarios.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alkhoury N, Singh T, Alsabbagh E, Guirguis J, Chami T, Hanounch I, et al. Isoprene in the exhaled breath is a novel biomarker for advanced fibrosis in patients with chronic liver disease: A pilot study. *Clin Transl Gastroenterol.* 2015;6(9):1-7.
- Amann A, Smith D. *Volatile Biomarkers: Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine.* 1ª ed. Amsterdam: Elsevier; 2013.
- Arasaradnam RP, McFarlane M, Daulton E, Skinner J, O'Connell N, Wurie S, et al. Non-invasive exhaled volatile organic biomarker analysis to detect inflammatory bowel disease (IBD). *Dig Liver Dis.* 2016;48(2):148–153.
- Barash O, Zhang W, Halpern JM, Hua QL, Pan YY, Kayal H, et al. Differentiation between genetic mutations of breast cancer by breath volatolomics. *Oncotarget.* 2015;6(42):44864–44876.
- Bodelier AGL, Smolinska A, Baranska A, Dallinga JW, Mujagic Z, Vanhees K, et al. Volatile organic compounds in exhaled air as novel marker for disease activity in Crohn's disease: A metabolomic approach. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(8):1776–1785.
- Bicchi C, Cordero C, Rubiolo P. A survey on high-concentration-capability headspace sampling techniques in the analysis of flavors and fragrances. *J Chromatogr Sci.* 2004;42(8): 402-409.
- Bond A, Greenwood R, Lewis S, Corfe B, Sarkar S, O'Toole P, et al. Volatile organic compounds emitted from faeces as a biomarker for colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49(8):1005–1012.
- Cacho JJ. Microextraction techniques coupled to gas chromatography-mass spectrometry by using thermal desorption. Analytical applications. *Grado en Química. Universidad de Murcia.* 2017;281(4):1–30.
- Chapman EA, Thomas PS, Stone E, Lewis C, Yates DH. A breath test for malignant mesothelioma using an electronic nose. *Eur Respir J.* 2012;40(2):448–454.
- Cromlab SL. Muestreo por Espacio de Cabeza. *Blog de Cromatografía.* [en línea]. [Consultado en Mayo de 2020]. Disponible en: <http://blog.cromlab.es/muestreo-por-espacio-de-cabeza-headspace-sampling-hs/>

- Dahl, J. Diagram of an ion mobility spectrometer. [en línea]. [Consultado en Mayo de 2020]. Disponible en:
https://en.wikipedia.org/wiki/File:Ion_mobility_spectrometry_diagram.svg
- Das S, Pal M. Review-Non-Invasive Monitoring of Human Health by Exhaled Breath Analysis: A Comprehensive Review. *J Elec. Soc.* 2020; 167: 037562.
- Fernandes MP, Venkatesh S, Sudarshan BG. Early Detection of Lung Cancer Using Nano-Nose - A Review. *Open Biomed Eng J.* 2015;9(1):228–233.
- Filipiak W, Sponring A, Filipiak A, Ager C, Schubert J, Miekisch W, et al. TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(1):182–195.
- Ghosh C, Singh V, Grandy J, Pawliszyn J. Recent advances in breath analysis to track human health by new enrichment technologies. *J Sep Sci.* 2020;43(1):226–240.
- Giannoukos S, Agapiou A, Brkić B, Taylor S. Volatolomics: A broad area of experimentation. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2019;1105:136–147.
- González-Zúñiga JA, González-Sánchez HM, González- Palomares S, Rosales-Reyes T, Andrade-González I. Microextracción en fase sólida de compuestos volátiles en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Univ.* 2011;21(1):17–22.
- Herrmann A. *The chemistry and biology of volatiles.* 1ª ed. Chichester (UK): Wiley; 2010.
- Horváth I, Barnes PJ, Loukides S, Sterk PJ, Högman M, Olin AC, et al. A european respiratory society technical standard: Exhaled biomarkers in lung disease. *Eur Respir J.* 2017;49(4): 1-32.
- Jareño-Esteban JJ, Muñoz-Lucas MÁ, Gómez-Martín Ó, Utrilla-Trigo S, Gutiérrez-Ortega C, Aguilar-Ros A, et al. Estudio de 5 compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol.* 2017;53(5):251–256.
- Kozma D. *Biomarcadores Para El Diagnóstico De Enfermedades Del Sistema Nervioso Central: Enfermedad De Alzheimer.* Grado en Farmacia. Universidad Complutense. 2010;30.

- Lechner M, Moser B, Niederseer D, Karlseder A, Holzknicht B, Fuchs M, et al. Gender and age specific differences in exhaled isoprene levels. *J. Respir. Physiol. Neurobiol.* 2006; 154: 478.
- Luque de Castro M.D, Valcárcel M, Tena M.T. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. España: Reverté; 1993.
- Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tuñón J, Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, et al. Biomarcadores en la medicina cardiovascular. *Rev Española Cardiol.* 2009;62(6):677–688.
- Mikoviny T, Kaser L, Wisthaler A. Development and characterization of a High-Temperature Proton-Transfer- Reaction Mass Spectrometer (HT-PTR-MS). *Atmos Meas Tech.* 2010;3(3):537–544.
- Ministerio para la transición ecológica. Gobierno de España. Emisiones de compuestos orgánicos volátiles [en línea]. [Consultado en Marzo de 2020]. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/act-emis/compuestos_organicos_volatiles.aspx
- Montoro A. Análisis de nuevos biomarcadores en el cáncer de próstata. Programa de doctorado en medicina. Universidad de Valencia; 2019.
- Morales MT, Aparicio-Ruiz R, Aparicio R. Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2013;8: 261-304.
- Muñoz MA. Valor de los compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado en el diagnóstico del cáncer de pulmón. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid; 2017.
- Nardi-Agmon I, Abud-Hawa M, Liran O, Gai-Mor N, Ilouze M, Onn A, et al. Exhaled breath analysis for monitoring response to treatment in advanced lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(6):827–837.
- Peinado I, Mason M, Biasioli F, Scampicchio M. Hyphenation of proton transfer reaction mass spectrometry with thermal analysis for monitoring the thermal degradation of retinyl acetate. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2018;32(1):57–62.
- Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol.* 2016;39(2):97–106.

- Salinero M. Marcadores volátiles urinarios como herramienta diagnóstica y de screening del cáncer de próstata. Tesis Doctoral María Salinero Bachiller; 2018.
- Sánchez-Cuellar S, Bermúdez JA. El uso de los biomarcadores de inflamación en la vía aérea en el manejo del asma. *Patología respiratoria*. 2012;15(4):129–135.
- Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008; 452: 548-553.
- Schumer EM, Trivedi JR, Van Berkel V, Black MC, Li M, Fu XA, et al. High sensitivity for lung cancer detection using analysis of exhaled carbonyl compounds Read at the 95th Annual Meeting of the American Association for Thoracic Surgery, Seattle, Washington. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;150(6):1517–1524.
- Silva CL, Passos M, Cmara JS. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br J Cancer*. 2011;105(12):1894–1904.
- Schmidt K, Podmore I. Solid phase microextraction (SPME) method development in analysis of volatile organic compounds (VOCS) as potential biomarkers of cancer. *J Mol Biomark Diagn*. 2015;6(6):1-11.
- Smith D, Španěl P, Enderby B, Lenney W, Turner C, Davies SJ. Isoprene levels in the exhaled breath of 200 healthy pupils within the age range 7-18 years studied using SIFT-MS. *J Breath Res*. 2010;4(1):17101.
- Sotelo JL, Ovejero G. Procesos con fluidos supercríticos. *An la Real Soc Española Química*. 2003;(4):15–23.
- Stashenko EE, Martínez JR. Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. *Sci Chromatogr*. 2011a;3(3):199–221.
- Stashenko EE, Martínez JR. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Sci Chromatogr*. 2011b;3(1):25–49.
- Taucher J, Hansel A, Jordan A, Fall R, Futrell JH, Lindinger W. Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer reaction mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom*. 1997; 11: 1230.
- Thriumani R, Zakaria A, Hashim YZHY, Jeffree AI, Helmy KM, Kamarudin LM, et al. A study on volatile organic compounds emitted by in-vitro lung cancer cultured cells using gas sensor array and SPME-GCMS. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–17.

- Vilches E. Desarrollo De Un Método De Análisis De Compuestos Mediante Espectrometría De Masas-Cromatografía De Gases Para Su Uso Como Biomarcadores En Aplicaciones Médicas. Grado en Ingeniería Química. Universidad Rey Juan Carlos. 2010;1-65.
- Wang C, Li P, Lian A, Sun B, Wang X, Guo L, et al. Blood volatile compounds as biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014a;15(2):200–206.
- Wang C, Sun B, Guo L, Wang X. Volatile organic metabolites identify patients with breast cancer, cyclomastopathy, and mammary gland fibroma. *Sci Rep*. 2014b;4:1–6.
- Wang T, Pysanenko A, Dryahina K, Španěl P. Analysis of breath, exhaled via the mouth and nose, and the air in the oral cavity. *J. Breath Res*. 2008; 2 (3): 37013.