



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PROPUESTA DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE GASES  
ENDÓGENOS EN EL ALIENTO HUMANO PRODUCIDOS POR  
*HELICOBACTER PYLORI*, MEDIANTE MEFS-CG-EM”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA**

PRESENTA

**LUZ AMAIRANI MALDONADO TAPIA**

ASESOR DE TESIS:

**DRA. PEÑA ÁLVAREZ ARACELI PATRICIA**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Mtro. Gómez Ruíz Humberto Ramon

**VOCAL:** Profesor: Dr. Del Río Portilla José Federico

**SECRETARIO:** Profesor: Dra. Peña Álvarez Patricia Araceli

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Q.F.B. García Ramírez Gloria

**2º SUPLENTE:** Profesor: Dr. Díaz Flores Luis Alejandro

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 101, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, POSGRADO, EDIFICIO B,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Mtra. Rocío del Carmen Juárez Ciprés

**SUSTENTANTE:**

---

Luz Amairani Maldonado Tapia

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales y compartirme sus instalaciones y recursos para realizar este proyecto.

Al Subprograma 127 “Formación básica en investigación” por brindarme apoyo económico a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A mis padres por todo su amor y apoyo incondicional. Gracias por impulsarme a cumplir todos mis sueños y por enseñarme valores que me han llevado a alcanzar mis metas.

A la Dra. Araceli Peña por su confianza y enseñanza, así como por su guía y dedicación para el desarrollo de este proyecto. Gracias por ser una pieza fundamental en mi formación académica.

A la Mtra. Roció Juárez, a la Dra. Irán Ocaña y al Mtro. Jerónimo Cabrera por la paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis compañeros del Laboratorio 101 Mariana y Diego, gracias por su agradable compañía.

A mis hermanos Cintia, Brandon y Adrián por su apoyo y cariño, este logro también es de ustedes; a mi amigo Andrés por sus consejos y ayuda.

A mis mejores amigas Diana y Vanne por escucharme y acompañarme en todas mis etapas.

A mis amigos de la Facultad de Química: Leo, Mich, Lupita, Abraham, Juan, Dani y mi comadre Monse por todos los momentos que compartimos.

A mi coach Luis y a mis amigos del Team Raptors por siempre alentarme y motivarme a creer en mí.

A los miembros del jurado por su tiempo y aportaciones a este trabajo.

A los voluntarios de donación de muestra de aliento que fueron parte importante para la realización de este proyecto.

*“Primer principio: no dejarse vencer nunca ni por las personas  
ni por los acontecimientos”*

-Marie Curie

# Índice

Índice.....	1
Lista de Tablas.....	3
Lista de Figuras.....	4
Lista de Abreviaturas.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Aliento.....	3
2.1.1. Aliento alveolar.....	4
2.1.2. Análisis de aliento.....	5
2.1.3. Biomarcadores en el aliento.....	7
2.1.4. Temperatura y humedad relativa del aliento.....	12
2.2. <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
2.2.1. Infección y permanencia de <i>H. pylori</i> .....	14
2.2.2. Tratamiento para <i>H. pylori</i> .....	15
2.2.3. Diagnóstico de <i>H. pylori</i> .....	17
2.3. Antecedentes experimentales.....	19
2.4. Recolección de muestra.....	21
2.4.1. Bolsa Tedlar.....	21
2.4.2. Bolsa FlexFoil PLUS.....	21
2.5. Preparación de muestra.....	22
2.5.1. Microextracción en Fase Sólida.....	23
2.6. Cromatografía.....	31
2.6.1. Cromatografía de gases.....	32
2.6.2. Sistema acoplado CG-EM.....	33
2.7. Espectrometría de masas.....	33
2.8. Análisis multivariados.....	37
2.8.1. Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo general.....	39
3.2. Objetivos particulares.....	39

4.	JUSTIFICACIÓN .....	40
5.	HIPÓTESIS .....	41
6.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	42
6.1.	Materiales e instrumentos .....	42
6.1.1.	Limpieza de material .....	42
6.2.	Reactivos y disolventes .....	43
6.3.	Condiciones cromatográficas.....	43
6.4.	Metodología .....	44
6.4.1.	HS-MEFS-CG de COVs atribuidos a <i>H. pylori</i> .....	44
6.4.2.	MEFS-CG de aliento .....	45
6.4.3.	MEFS-CG-EM de aliento.....	49
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
7.1.	HS-MEFS-CG de COVs atribuidos a <i>H. pylori</i> .....	51
7.3.	MEFS-CG-EM de aliento. ....	54
8.	CONCLUSIONES .....	70
9.	Bibliografía .....	71
	ANEXO I.....	76
	ANEXO II.....	80

## Lista de Tablas

Tabla 1. Compuestos orgánicos presentes en el aliento humano y relación con diversas patologías. ....	10
Tabla 2. Tratamientos recomendados para la terapia de erradicación de <i>H. pylori</i> . ....	15
Tabla 3. Características de los analitos.....	20
Tabla 4. Metodologías para el análisis de aliento donde se empleó el uso de contenedores de aliento. ....	22
Tabla 5. Tipos de recubrimientos de fibra para MEFS disponibles comercialmente. ....	26
Tabla 6. Criterios para la selección del modo de muestreo.....	30
Tabla 7. Métodos de agitación en MEFS. ....	30
Tabla 8. Analizadores de masas. ....	35
Tabla 9. Características de voluntarios de muestra de aliento.....	46
Tabla 10. Características de los voluntarios.....	50
Tabla 11. Resultados de evaluación de tiempo de extracción de HS-MEFS-CG. .	51
Tabla 12. COVs identificados en muestras de aliento. ....	55
Tabla 13. Identificación de COVs en aliento (n=2). ....	59

## Lista de Figuras

Figura 1. Volúmenes fraccionarios de respiración para un hombre promedio sano en reposo. [Modificada de Pleil & Lindstrom, 1995] .....	5
Figura 2. Formación de cuerpos cetónicos: acetona. [Modificada de Ochs, R. S. 2022] .....	9
Figura 3. Infección de <i>H. pylori</i> .....	16
Figura 4. Pruebas clínicas para el diagnóstico de <i>H. pylori</i> .....	17
Figura 5. Espectrofotómetro. La bolsa azul corresponde a la muestra basal y la rosa a la realizada a los 20 minutos de administrar la Urea con C <sup>13</sup> .....	18
Figura 6. Clasificación de métodos de preparación de muestra sin disolventes. [Modificada de Pawliszyn, 1997] .....	22
Figura 7. Parámetros típicos considerados en MEFS para su desarrollo y optimización. [Modificada de Pawliszyn, 1997] .....	25
Figura 8. Comparación de los mecanismos de extracción: adsorción y absorción. Los diagramas de lado izquierdo ilustran el estado inicial. Los diagramas de lado derecho ilustran el estado estacionario. [Tomada de Górecki, et. al., 1999] .....	27
Figura 9. Dibujo de partícula de Carboxen, ilustrando el rendimiento del poro.[Tomada de Shirey, 2012].....	28
Figura 10. Dibujo de una fibra Carboxen-PDMS. [Tomada de Shirey, 2012] .....	29
Figura 11. Modos de operación de MEFS: (a) inmersión directa; (b) MEFS headspace; y (c) MEFS protegida por membrana. [Modificada de Pawliszyn, 2012] .....	29
Figura 12. Esquema de un cromatógrafo de gases. [Modificada de DCTech 2015] .....	33
Figura 13. Esquema de una fuente de iones por ionización electrónica.[Tomada de Sparkman, 2011].....	35
Figura 14. Esquema y fotografía de analizador de masas de cuadrupolo lineal. [Tomada de Thompson,2018] .....	36
Figura 15. HS-MEFS-CG de COVs atribuidos a <i>H. pylori</i> . .....	45
Figura 16. Esquema de recolección de un voluntario.....	46
Figura 17. Boquilla para toma de aliento (A); Válvula de propileno (B); Bolsa FlexFoil PLUS (C).....	47
Figura 18. Toma de aliento a voluntario. ....	48
Figura 19. Análisis de aliento con MEFS-CG (A); Análisis de aliento con MEFS-CG-EM (B). ....	49
Figura 20. Perfil de extracción de solución estándar a 10 µg/L.....	51
Figura 21. Cromatogramas de disolución estándar y estándares internos: A) acetato de metilo y B) acetato de propilo. ....	52
Figura 22. Cromatogramas de evaluación de tiempo de extracción de aliento A) 5 min y B) 10 min. ....	53
Figura 23. Compuestos producidos por <i>H. pylori</i> en muestra de A) la mañana y de B) la tarde.....	57



Figura 24. Cromatograma iónico total (TIC) de una muestra de aliento de la tarde de un voluntario sano hombre adulto. ....	58
Figura 25. Matriz para análisis PLS-DA. ....	61
Figura 26. Gráfica de “scores” (PLS-DA) correspondiente a las 30 muestras de aliento de todos los voluntarios. ....	62
Figura 27. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de <i>H. pylori</i> vs voluntarios sanos. ....	63
Figura 28. Gráfica de “scores” (PLS-DA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. ....	64
Figura 29. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de Hombre Adulto, Hombre Joven, Mujer Adulta y Mujer Joven. ..	65
Figura 30. Gráfica de “scores” (PLS-DA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. ....	66
Figura 31. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de Hombre y Mujer. ....	67
Figura 32. Gráfica de “scores” (PLS-DA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. ....	68
Figura 33. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de dieta Tradicional y Vegana/Vegetariana. ....	69
Figura 34. Gráfico de “scores” de PLS-DA para dos categorías. ....	79
Figura 35. Gráfica de “scores” (PCA) correspondiente a las 30 muestras de aliento de todos los voluntarios. ....	80
Figura 36. Gráfica de “scores” (PCA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. ....	80
Figura 37. Gráfica de “scores” (PCA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. ....	81
Figura 38. Gráfica de “scores” (PCA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. ....	81

## **Lista de Abreviaturas**

AcO: Acetato

CC: Corriente continua

CG: Cromatografía de gases

CGxCG-TOF: Cromatografía de gases bidimensional con detector de tiempo de vuelo

COVs: Compuestos orgánicos volátiles

CSV: Clasificación de vectores de soporte

CSVs: Compuestos sulfurados volátiles

CV: Coeficiente de variación

DMS: Dimetilsulfuro

DVB: Divinilbenceno

ELISA: Enzimoimmunoanálisis de adsorción

EM: Espectrometría de masas

EM-SIFT: Espectrometría de masas con tubo de flujo de iones seleccionados

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

HS: Headspace (espacio de cabeza)

IBP: Inhibidor de bomba de protones

ID: Inmersión directa

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

MALT: Linfoma de mucosa de tejido linfóide

MEFS: Microextracción en fase sólida

NIST: Instituto Nacional de Estandarización y Tecnología de EUA

PA: Poliacrilato

PCA: Análisis de componentes principales

PDMS: Polidimetilsiloxano

PEG: Polietilenglicol

PFBHA: Clorhidrato de hidroxilamina O-2,3,4,5,6-(pentafluorobencilo)

PLS-DA: Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales

ppb: partes por billón  
ppm: partes por millón  
ppt: partes por trillón  
PTV: Vaporizador con temperatura programada  
RF: Radiofrecuencia  
SCAN: Barrido total de iones  
SFE: Extracción con fluidos supercríticos  
SOM: Mapas autoorganizados  
SPE: Extracción en fase sólida  
SVR: Regresión de vectores de soporte  
TD: Tubos de desorción térmica  
TIC: Cromatograma iónico total  
VA: variabilidad analítica  
VB: variabilidad biológica  
VBG: variabilidad biológica grupal  
VBI: variabilidad biológica individual  
VT: variabilidad total

## 1. INTRODUCCIÓN

El análisis de fluidos del cuerpo humano, como el aliento, es una herramienta fundamentalmente importante de la medicina moderna para obtener información de procesos fisiológicos que suceden dentro del cuerpo (Di Francesco, et.al., 2005). La matriz de aliento es una mezcla de nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono, agua y gases inertes; una fracción pequeña remanente que consiste en compuestos de concentraciones en intervalos de nmol/L-pmol/L expresados de otra forma en partes por millón (ppm) o partes por trillón (ppt). Estos compuestos pueden ser generados dentro del cuerpo (endógenos) o absorbidos del ambiente (exógenos). Los compuestos endógenos se conforman por gases inorgánicos y compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Miekisch, et.al, 2004), que pueden ser emitidos por diferentes cepas bacterianas, por ejemplo, en el sistema digestivo se ha reportado que bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria meningitidis* producen etanol, formaldehído, acetaldehído, sulfuro de hidrógeno, metanotiol, sulfuro de dimetilo y otros (Ulanowska, et. al., 2011).

La bacteria *Helicobacter pylori* se reconoce como un importante agente causal de enfermedades gastroduodenales, como gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) (Ohno et al., 2003). Los COVs que se han reportado producidos por *H. pylori* son isobutano, 2-butanona y acetato de etilo. Para el diagnóstico de esta infección bacteriana existe tanto una prueba de aliento con urea, en la cual el paciente tiene que ingerir urea marcada isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ , así como la endoscopia la cual es una prueba invasiva.

Generalmente los compuestos producidos por esta bacteria se encuentran a nivel de trazas, por tanto, es necesario una preconcentración. La técnica microextracción en fase sólida (MEFS) permite en un solo paso la extracción y preconcentración de los analitos, no utiliza disolventes y puede ser acoplado fácilmente con las técnicas

cromatográficas (Ceccarini et al., 2012). La alta eficiencia de separación por cromatografía de gases (CG) así como la alta capacidad de identificación de espectrometría de masas (EM) hacen de CG-EM el método más común utilizado para medir concentraciones bajas de COVs presentes en el aliento humano.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue hacer una propuesta de una metodología para identificar gases endógenos en el aliento humano producidos por *H. pylori* mediante microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Aliento

El aliento humano es una mezcla compleja de nitrógeno (~78%), oxígeno (~15%), dióxido de carbono (~4%), vapor de agua (~6%), gases inertes (~0.96%), compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos. (Ligor et al., 2008; Ulanowska, et. al., 2011) De acuerdo a Gallego (2016), los compuestos orgánicos presentes en el aliento se clasifican en tres grupos debido a su origen:

- Grupo I. Compuestos de origen sistémico o endógeno: Son los compuestos que circulan en la sangre y son capaces de ser eliminados a través de los alvéolos pulmonares o mediante las glándulas salivales; pueden ser volátiles o no. Los compuestos volátiles pueden ser orgánicos (COVs) o inorgánicos. Los COVs generalmente son hidrocarburos, alcoholes, cetonas, aldehídos, esterres y alcanos. También hay presentes compuestos no volátiles en el aire expirado, por ejemplo: isoprostanos, citosinas, leucotrienos, peróxido de hidrógeno, etc.
- Grupo II. Compuestos de origen extra sistémico o exógeno: En este grupo se encuentran los compuestos presentes en el aparato respiratorio superior. La mayor parte de estos compuestos son provenientes del ambiente que respiramos o de la actividad bacteriana bucal.
- Grupo III. Compuestos sulfurados volátiles (CSV): Son aquellos que contienen azufre en su composición, se ha demostrado que son los responsables de la halitosis, olor de la boca. Los CSV más frecuentes son el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), el metilmercaptano ( $CH_3SH$ ) y el dimetilsulfuro ( $(CH_3)_2S$ ).

### 2.1.1. Aliento alveolar

Contrastado con el aire ambiental, la respiración exhalada de un individuo es periódica (normalmente 10-15 respiraciones por minuto) y una respiración típica individual no es homogénea sino compuesta por: 350 mL de "aliento alveolar" (en el que se produce el intercambio gaseoso sangre/aliento dentro del pulmón) y 150 mL de aire de "espacio muerto" que llenan la boca, la tráquea y bronquios, y por lo tanto no participan en el intercambio de gases. Esa parte del volumen pulmonar que se intercambia por aire fresco durante la respiración se llama el "volumen corriente" y se compone de aire del espacio muerto y parte del aire alveolar.

Además de los volúmenes respiratorios normales de un sujeto en reposo, existe un volumen finito que nunca sale de los pulmones: el volumen residual, como en una respiración profunda o durante el ejercicio. La Figura 1 ilustra las particiones de la respiración y da sus volúmenes relativos con respecto a la capacidad de aire total del pulmón. Los investigadores prefieren analizar la fracción alveolar del aire exhalado, ya que refleja el intercambio sangre/aliento que no se diluye, haciendo que la medición cuantitativa sea realista. Además, la frecuencia respiratoria y la profundidad de la inhalación pueden variar mucho entre los individuos. Por lo tanto, cualquier método para recolectar muestras de aliento debe adaptarse a estas diferencias, y así producir una muestra representativa. (Pleil & Lindstrom, 1995)

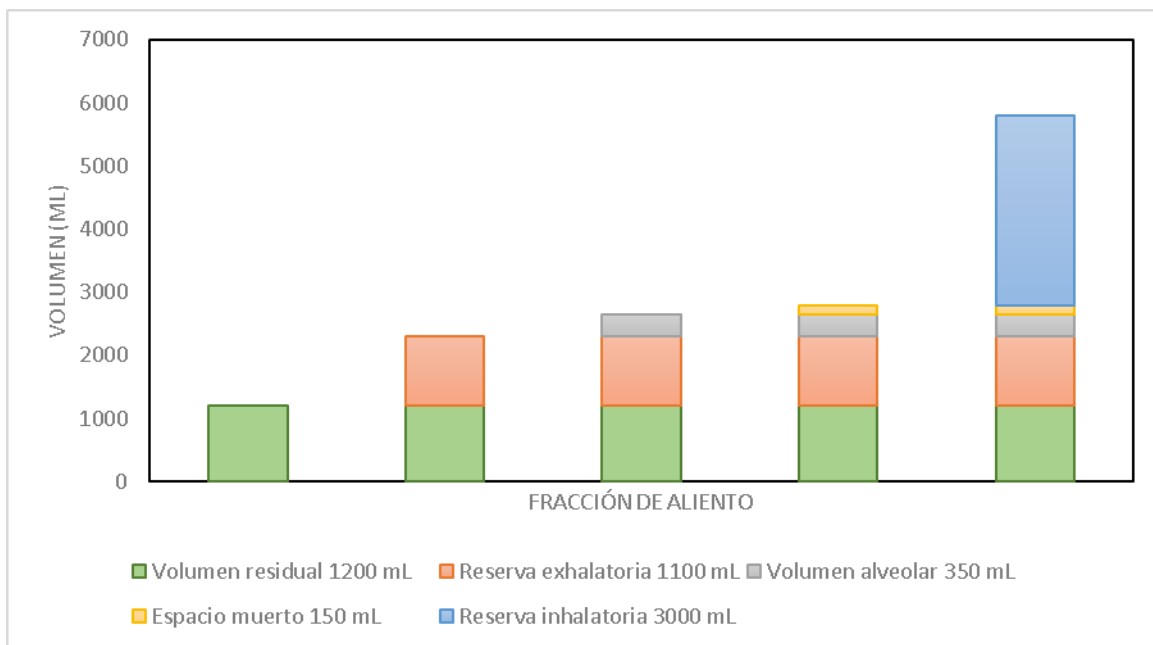


Figura 1. Volúmenes fraccionarios de respiración para un hombre promedio sano en reposo. [Modificada de Pleil & Lindstrom, 1995]

### 2.1.2. Análisis de aliento

El análisis de los fluidos corporales es una herramienta fundamentalmente importante en la medicina que ofrece ventajas como la recolección poco invasiva y una matriz más simple. El análisis de aliento se ha propuesto como un método complementario de los métodos de análisis de sangre, orina y heces.

En el artículo “Analytical challenges in breath analysis and its application to exposure monitoring” de Alonso & Sanchez, (2013) se menciona que el aliento se puede analizar con dos objetivos:

- El diagnóstico clínico para analizar compuestos volátiles generados en el organismo y eliminados a través del aire exhalado (compuestos endógenos).
- Análisis de exposición para tener información rápida y precisa sobre los niveles de COVs inhalados potencialmente nocivos que llegan al torrente sanguíneo (compuestos exógenos).



El análisis de aliento para el diagnóstico clínico ha recibido mayor interés debido a su potencial para detectar el estado de una enfermedad en el paciente de una manera simple y no invasiva.

### ***Variabilidad***

La variabilidad en los datos de medición tiene diferentes componentes independientes que normalmente se combinan de forma aditiva, dos importantes fuentes de variación son las biológicas y analíticas, cada una de las cuales se combina para formar la variabilidad total medida por la varianza total.

La variabilidad total se define como la raíz cuadrada de la suma del cuadrado de la variabilidad biológica (VB) más el cuadrado de la variabilidad analítica (VA).

$$VT = \sqrt{VB^2 + VA^2}$$

### ***Variabilidad analítica***

Los factores que se atribuyen a la variabilidad analítica son los que intervienen en la obtención de un resultado de laboratorio, desde la toma de muestras hasta el reporte de los resultados.

Factores que contribuyen a la variabilidad analítica

- Temperatura
- Calibradores
- Reactivos
- Analizadores
- Interferencias
- Interpretación

### ***Variabilidad biológica***

La variabilidad biológica se ha definido como la resultante de todos los factores que interactúan en y entre los individuos para condicionar el estado de salud o enfermedad.

Factores que influyen en la variabilidad biológica:

- Edad
- Sexo
- Raza
- Salud
- Embarazo
- Dieta
- Ejercicio
- Fármacos
- Consumo de tabaco y alcohol

Existen dos niveles de variabilidad biológica: variabilidad biológica individual (VBI) y variabilidad biológica grupal (VBG).

### **2.1.3. Biomarcadores en el aliento**

Actualmente se han identificado más de 1,000 compuestos presentes en el aliento. En estudios previos se encontró que la concentración de muchos de estos compuestos es baja, desde ppb hasta ppt (Španěl & Smith, 2020).

En el aliento exhalado aproximadamente 35 compuestos han sido establecidos como biomarcadores de enfermedades particulares y trastornos metabólicos. La formación de estos biomarcadores se atribuye a las reacciones bioquímicas que suceden dentro del cuerpo como parte de procesos metabólicos. Por ejemplo, la acetona, principalmente resulta de la descarboxilación espontánea del acetoacetato y de la conversión enzimática del acetoacetato en acetona (Wang & Sahay, 2009).

### ***Acetona en el aliento***

La acetona es una sustancia que se produce a partir de acetil-CoA en las mitocondrias del tejido hepático que, en situación de ayuno, se distribuye a través del sistema circulatorio por todos los tejidos, sirviendo como fuente de energía para el corazón, el músculo y otros tejidos.

La cetogénesis es el proceso de la creación de los cuerpos cetónicos. La ruta metabólica que produce acetona se muestra en la Figura 2. Consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por acción de la tiolasa, formando la acetoacetil-CoA. Después se fusiona con una nueva molécula de acetil-CoA, por la acción de la enzima hidroximetilglutaril-CoA sintasa, que origina el hidroximetilglutaril-CoA. Posteriormente el hidroximetilglutaril-CoA se divide en acetil-CoA y acetoacetato. Por descarboxilación del acetoacetato se forma la acetona. A continuación, la acetona sale de la mitocondria y atraviesa la célula hepática hasta llegar a la sangre, que la distribuye por todo el organismo (Ochs, 2022), llegando a los pulmones donde al exhalar, la acetona se libera en el aliento.

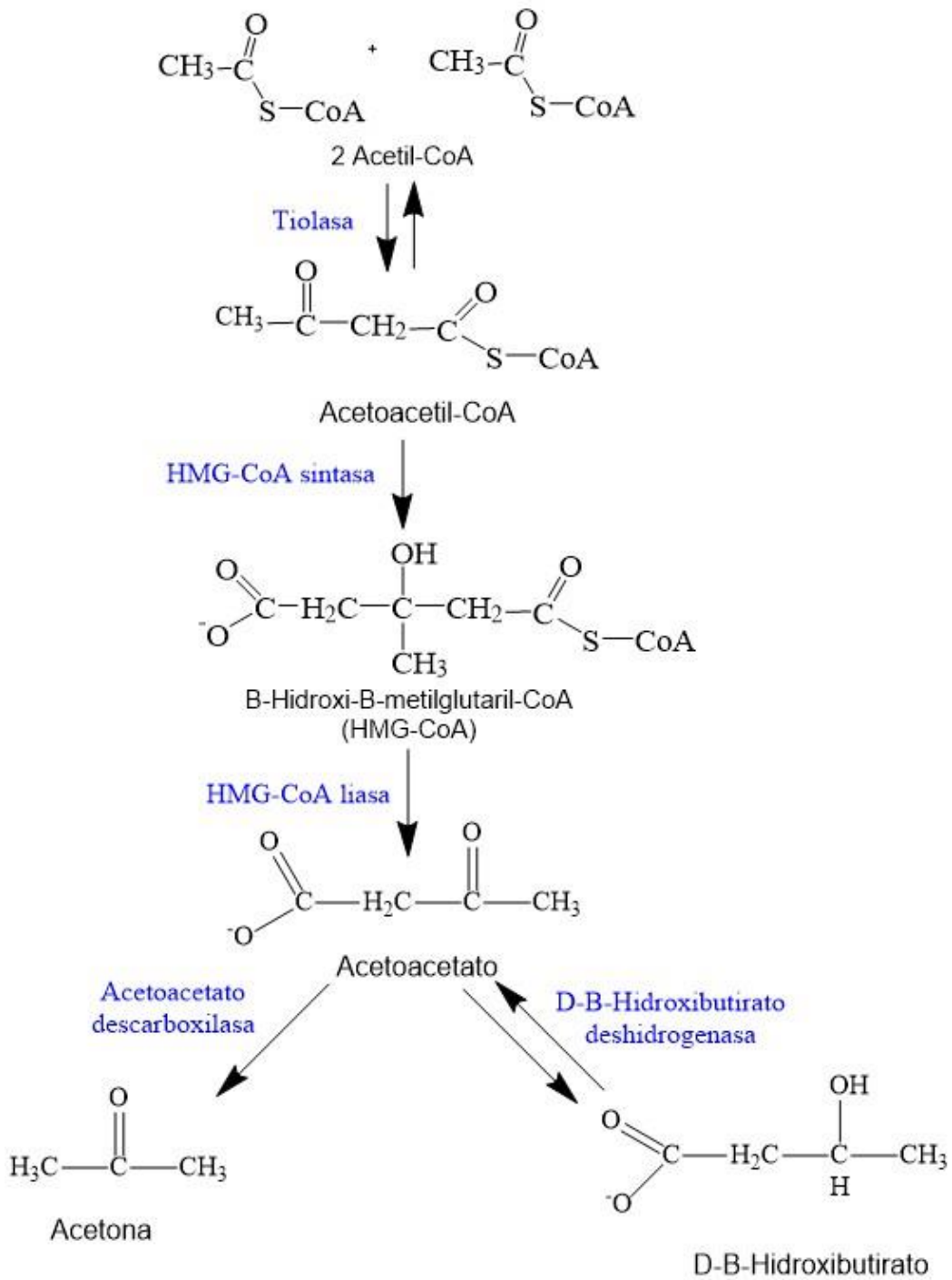


Figura 2. Formación de cuerpos cetónicos: acetona. [Modificada de Ochs, R. S. 2022]

Dependiendo del estado de salud de una persona, la cantidad producida de estos compuestos volátiles resultó ser diferente (André, et. al., 2020). Por ejemplo, la presencia de amoníaco en aliento humano de una persona sana oscila entre (500-2100) ppb, mientras que la cantidad medida en un paciente que padece una enfermedad renal está entre (820-14700) ppb. También la concentración de acetona en el aliento exhalado de pacientes diabéticos es generalmente superior a 1800 ppb, mientras que la concentración de gas acetona en el aliento exhalado de individuos sanos es inferior a 900 ppb.

En la Tabla 1 se muestran los compuestos orgánicos volátiles presentes en el aliento que se han identificado como biomarcadores de alguna enfermedad.

Tabla 1. Compuestos orgánicos presentes en el aliento humano y relación con diversas patologías.

BIOMARCADORES IDENTIFICADOS EN EL ALIENTO Y SUS SÍNTOMAS FISIOLÓGICOS	
Biomarcador	Enfermedad o trastorno metabólico asociado
Acetona	Cáncer de pulmón, diabetes, insuficiencia cardiaca, convulsiones cerebrales
Acetaldehído	Alcoholismo, enfermedades relacionadas con el hígado, cáncer de pulmón
Amoníaco	Enfermedades renales, asma
Butano	Marcadores tumorales en el cáncer de pulmón
Monóxido de carbono	Estrés oxidativo, infecciones respiratorias, anemia
Disulfuro de carbono	Esquizofrenia, enfermedades coronarias y arteriales
Dióxido de carbono	Estrés oxidativo
Sulfuro de carbonilo	Enfermedades del hígado

Etano	Deficiencia de vitamina E, peroxidación de lípidos, estrés oxidativo
Etanol	Producción de bacterias intestinales
Etileno	Peroxidación de lípidos
Hidrógeno	Indigestión en bebés, malestar intestinal, fermentación colónica
H/D isótopo	Agua corporal
Peróxido de hidrógeno	Asma
Cianuro de hidrógeno	Pseudomonas aeruginosa en niños con fibrosis quística
8-isoprostanos	Estrés oxidativo
Isopreno	Colesterol sanguíneo
Metano	Problemas intestinales, fermentación colónica
Metanotiol	Halitosis
Metanol	Trastornos del sistema nervioso
Aminas metiladas	Metabolismo de las proteínas en el cuerpo
Nitrato de metilo	Hiperglucemia en la diabetes
Monóxido de nitrógeno	Asma, bronquiectasias, hipertensión, rinitis, enfermedades pulmonares
Nitrotirosina	Asma
Oxígeno	Respiración
Pentano	Peroxidación de lípidos, enfermedades hepáticas, esquizofrenia, cáncer de mama, artritis reumatoide

Piridina	Enfermedad periodontal
Compuestos de azufre	Mal olor hepático, cáncer de pulmón
Hidrocarburos (tolueno, benceno, heptano, decano, estireno, octano, pentametilheptano)	Peroxidación lipídica, cáncer de pulmón, estrés oxidativo, inflamación de vías respiratorias

[Tomada de Wang, P. Sahay, 2009]

#### 2.1.4. Temperatura y humedad relativa del aliento

Dos variables importantes en el análisis de aliento son la temperatura y la humedad relativa, especialmente en la detección de COVs relacionados con enfermedades. Varios estudios han informado que el intervalo de temperatura de la respiración exhalada es indiferente geográficamente y que la temperatura promedio del aliento de una persona sana es de 34.5 °C (Cowan, et. al., 2010; P Paredi et al., 2002; P. Paredi, et. al., 2003; Svensson, et. al., 2012).

En el artículo “Measurement of temperature and relative humidity in exhaled breath” de Mansour et al., 2020, reportó que la humedad relativa y la temperatura del aire exhalado son dependientes de factores ambientales y del sujeto. También que la humedad relativa es mayor en las mujeres que en los hombres.

## 2.2. *Helicobacter pylori*

La bacteria *Helicobacter pylori* es un bacilo flagelado que es patógeno potencial para el ser humano (Bosques-padilla, et. al., 2018). Se reconoce como un importante agente causal en enfermedades gastroduodenales, como la inflamación en el estómago (gastritis crónica), la ulceración del estómago o el duodeno (úlceras pépticas), adenocarcinoma gástrico y asociado al linfoma de mucosas de tejido linfoide (Ohno et al., 2003).

*H. pylori* es extremadamente variable y las cepas difieren notablemente en muchos aspectos, como la adherencia a la mucosa gástrica y la capacidad de provocar inflamación. Incluso en un solo individuo infectado, las bacterias no son idénticas, y durante el curso de la infección crónica se adaptan a las condiciones cambiantes del estómago con el tiempo. Así mismo, las variaciones genéticas entre humanos pueden afectar su susceptibilidad. Esta infección crónica se inicia en el antro del estómago, la presencia de *H. pylori* siempre se asocia con una inflamación de la mucosa gástrica subyacente, y la infiltración de células inflamatorias. En la Figura 3 se ilustra la infección bacteriana de *H. pylori* que genera la inflamación de la mucosa gástrica que posteriormente causa úlceras duodenales o gástricas.

Aproximadamente el 50% de los seres humanos tienen colonias de *H. pylori* en la parte inferior del estómago (antro). En la mayoría de los individuos, la infección por *H. pylori* es asintomática. Sin embargo, alrededor del 10-15% de las personas infectadas experimentarán en algún momento la enfermedad de úlcera péptica. Tales úlceras son más comunes en el duodeno que en el estómago mismo. Las complicaciones graves incluyen sangrado y perforación (NobelPrize.org, 2005), por lo tanto, son necesarios métodos de diagnóstico precisos, rápidos y no invasivos para su detección temprana.



### **2.2.1. Infección y permanencia de *H. pylori***

La infección generalmente se contrae en la primera etapa de la infancia, posiblemente de los padres u otros niños que viven como contactos cercanos, una vez que se da la infección, la bacteria puede permanecer en el estómago por el resto de la vida de la persona.

Los seres humanos parecen ser el único reservorio de *H. pylori*, que se transmite de persona a persona por vía oral-oral, fecal-oral o gastro-oral. La infección del medio ambiente o de los animales no se puede excluir por completo. La identificación del modo de transmisión es vital para desarrollar medidas preventivas para interrumpir su propagación, pero los estudios centrados en este tema son difíciles de implementar (Oderda, 1999).

A partir de estudios epidemiológicos se sabe que existen grandes diferencias en la prevalencia de la infección en diferentes poblaciones, es probable que esto esté relacionado con condiciones higiénicas.

En el año 1998 en México se realizó un estudio de seroprevalencia a *H. pylori*, es decir, se analizó a un número de personas de la población que dieron positivo a la infección de *H. pylori* a través de muestras serológicas (suero sanguíneo). Se evaluó 11,605 sueros de personas de 1 a 90 años de todos los niveles socioeconómicos y demográficos de todas las regiones de México. Los anticuerpos contra *H. pylori* se estudiaron mediante la prueba ELISA y se obtuvo que el 66% de la población estaba infectada y que la edad era el factor de riesgo más fuerte para la infección. A la edad de 1 año, el 20% estaba infectado y a los 10 años, el 50% estaba infectado. El hacinamiento, el bajo nivel educativo y el nivel socioeconómico bajo fueron factores de riesgo para la infección, mientras que la prevalencia fue similar en las comunidades urbanas y rurales (Torres et al., 1998).

### 2.2.2. Tratamiento para *H. pylori*

Los antimicrobianos anti-*H. pylori* más utilizados en todo el mundo son la amoxicilina, claritromicina, metronidazol, clorhidrato de tetraciclina, entre otros. Por lo general se prescriben con un inhibidor de la bomba de protones (IBP). En la Tabla 2 se presentan las recomendaciones generales para el tratamiento de infección de *H. pylori*.

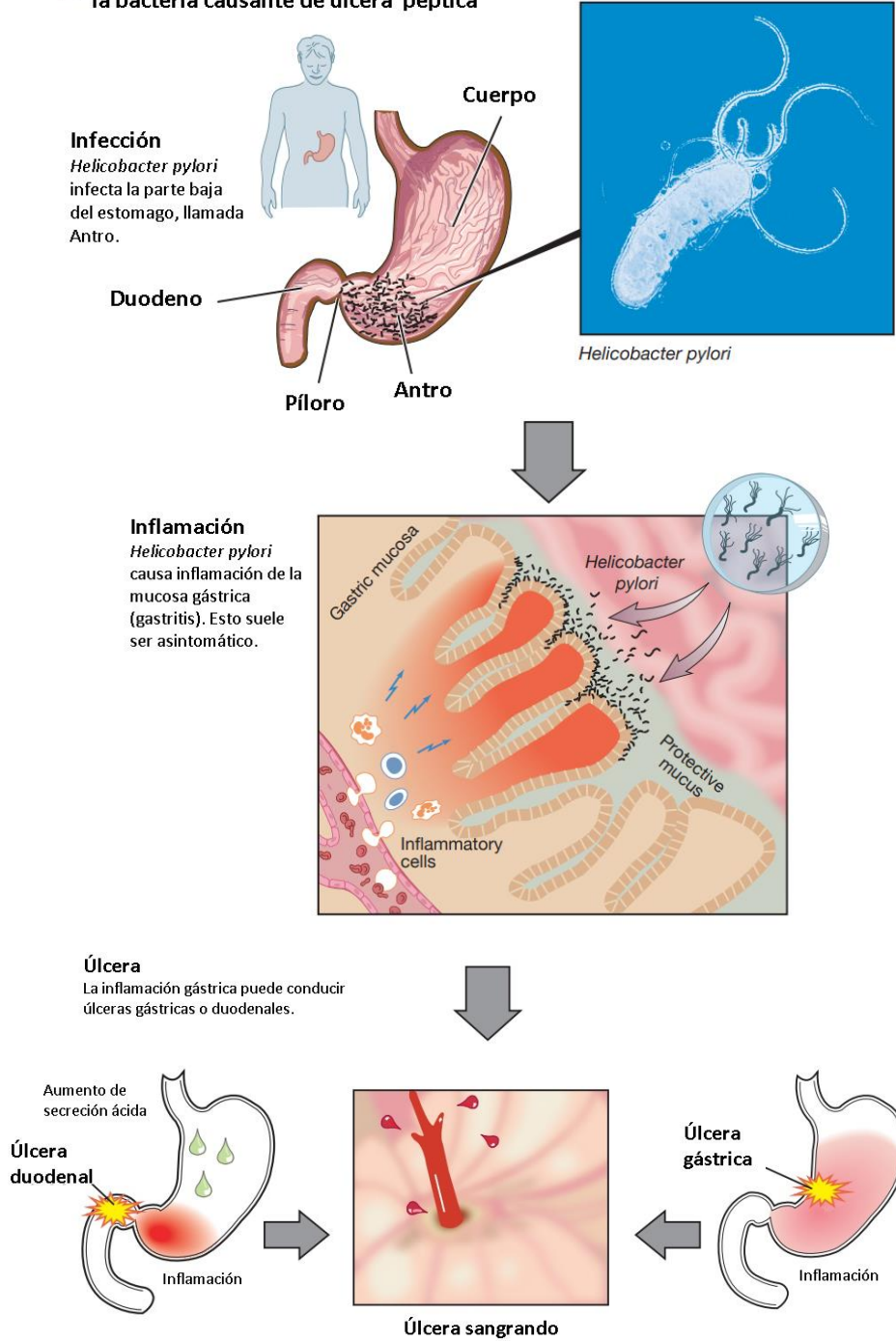
Tabla 2. Tratamientos recomendados para la terapia de erradicación de *H. pylori*.

Tratamiento	Fármacos, dosis, duración
Terapia concomitante	Amoxicilina (1 g), claritromicina (500 mg) y tinidazol (500 mg) o metronidazol (500 mg) más IBP (40 mg de omeprazol), todos administrados dos veces al día durante 14 días.
Terapia secuencial	Amoxicilina (1 g) más un IBP dos veces al día durante 7 días, seguido de claritromicina (500 mg) y tinidazol (500 mg) o metronidazol (500 mg) más un IBP (40 mg de omeprazol) todos dos veces al día durante un período adicional, 7 días (14 días en total).
Terapia híbrida secuencial-concomitante	Amoxicilina (1 g) más un IBP dos veces al día (40 mg de omeprazol) durante 7 días, seguido de amoxicilina (1 g), claritromicina (500 mg) y tinidazol (500 mg) o metronidazol (500 mg) durante un período adicional, 7 días (14 días en total).
Terapia cuádruple de bismuto	Subsalicilato de bismuto o subcitrato de bismuto 2 comprimidos y clorhidrato de tetraciclina (500 mg) ambos cuatro veces al día con las comidas y al acostarse más metronidazol/tinidazol (500 mg) tres veces al día con las comidas y un IBP dos veces al día durante 14 días.

Tabla modificada de Kim, 2016

## Helicobacter pylori

— la bacteria causante de úlcera péptica



© The Nobel Committee for Physiology or Medicine

Figura 3. Infección de *H. pylori*.

[Comunicado de prensa. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. Vie. 27 de enero de 2023. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2005/press-release/>]

### 2.2.3. Diagnóstico de *H. pylori*

En una revisión de las pruebas para el diagnóstico de *H. pylori*, realizado por Azad et al., 2022, se menciona una forma de organización de las pruebas diagnóstico mostrado en la Figura 4:

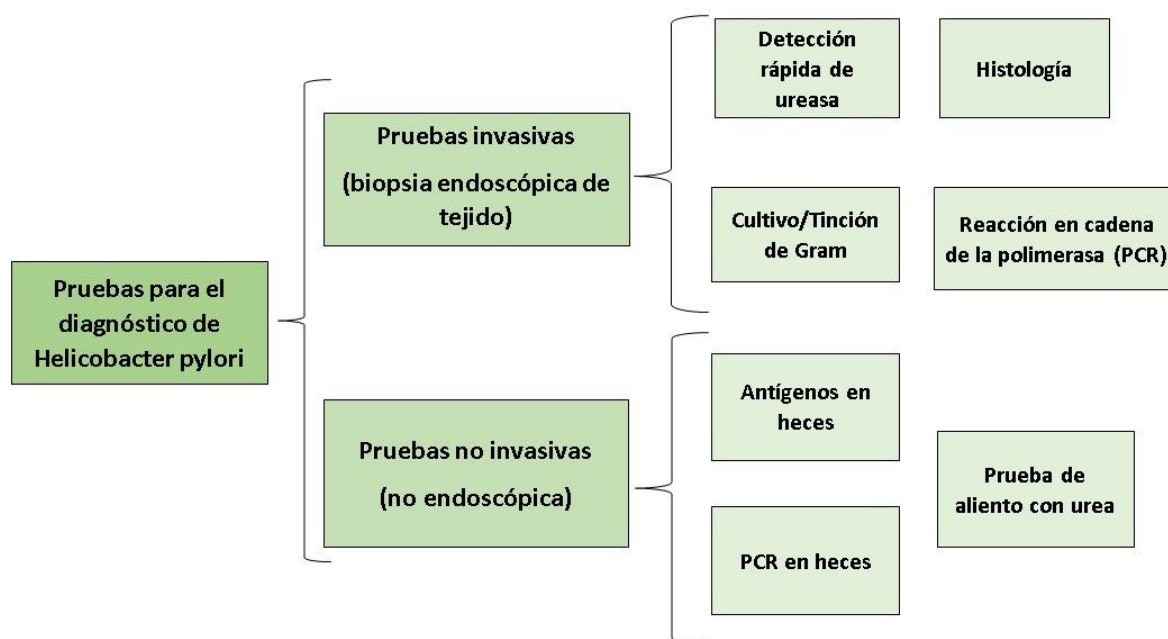


Figura 4. Pruebas clínicas para el diagnóstico de *H. pylori*.

#### **Prueba de aliento con urea**

En diversos laboratorios clínicos se ha implementado el uso de esta técnica ya que la prueba de aliento con urea es una prueba no invasiva, segura, fácil, económica y confiable, comparada con otras pruebas diagnóstico, para la detección de la infección por *H. pylori*.

En la página web del Hospital Mediterráneo de Exploraciones Digestivas Funcionales en Almería, España, se describe el procedimiento de esta prueba:

La prueba consiste en tomar dos muestras de aliento soplando dentro de una bolsa. La primera muestra se toma en situación basal y la segunda 20 minutos después de la anterior, tras haber ingerido una pastilla con urea marcada con  $^{13}\text{C}$ .

La bacteria *H. pylori* tiene la capacidad de descomponer la urea mediante la enzima ureasa, por lo que libera el  $^{13}\text{CO}_2$  que pasa a la sangre y de ahí a los pulmones, excretándose por el aliento.

Las muestras de aire se analizan contando las moléculas de  $^{13}\text{CO}_2$ . Si el incremento de  $^{13}\text{CO}_2$  entre la muestra basal y la tomada a los 20 minutos es igual o mayor a 2500 unidades se considera una prueba positiva y por tanto es diagnóstico de infección por *H. pylori*.



Figura 5. Espectrofotómetro. La bolsa azul corresponde a la muestra basal y la rosa a la realizada a los 20 minutos de administrar la Urea con  $\text{C}^{13}$ .

*[Tomada de "Test de aliento H. pylori - Exploraciones Digestivas Funcionales" ]*

No existe contraindicaciones para la realización de la prueba de aliento con urea ni tampoco se ha descrito efectos secundarios relevantes por la toma de  $^{13}\text{C}$ -urea.

El diagnóstico es inmediato ya que los resultados se pueden obtener a los 2 minutos de poner en lectura las bolsas que contienen el aire espirado.

### 2.3. Antecedentes experimentales

El análisis de aliento con fines diagnóstico tiene una larga historia. En la antigua Grecia ya sabían que el aliento humano podía proporcionar pistas para el diagnóstico de un padecimiento; por ejemplo, sabían que la existencia de un aliento con olor dulce era una señal peligrosa; en la actualidad los médicos modernos saben que el aire exhalado por los pacientes con cetoacidosis diabética huele dulce como “manzanas podridas”.

En la década de 1970 Pauling fue pionero en el análisis de aliento, identificando más de 200 compuestos en el aliento humano exhalado. Algunos de estos compuestos se asociaron con diferentes condiciones patológicas.

En un artículo publicado por Plebani, et. al., (1999) se hizo un estudio con el objetivo del muestreo de benceno, como un biomarcador a la exposición ocupacional, en un método de análisis para aliento exhalado. La metodología consistió en calentar por 30 minutos a 40 °C una bolsa Tedlar de capacidad de 3 L con la muestra de aliento en su interior, seguido de transferir la muestra a una Bolsa Tedlar de capacidad de 1 L, la transferencia se hizo pasando la muestra por una trampa de  $\text{CaCl}_2$ . Posteriormente a la Bolsa de 1L con la muestra de aliento se le inyectó 30  $\mu\text{L}$  de estándar interno (benceno deuterado) a 40 °C. Finalmente 100 mL de muestra fueron inyectados en un CG-EM.

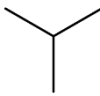
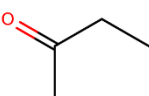
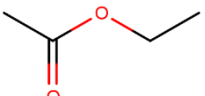
La técnica microextracción en fase sólida (MEFS) desarrollada en 1989 fue una mejora en el muestreo de aliento debido a que simplificó los problemas metodológicos como son la alta humedad del aliento y la presencia de ciertos vapores endógenos. Así como la preconcentración de compuestos volátiles de una manera rápida.

En el año 2000, se hizo la determinación de isopreno en aliento humano expirado: en una bolsa Tedlar de capacidad de 8 L se tomó la muestra de aliento de un voluntario, posteriormente se llenó con  $\text{N}_2$  y se agregó lentamente el estándar de calibración de isopreno, se calentó por 5 min a 40 °C. en seguida se introdujo una fibra de MEFS con recubrimiento de Carboxen/PDMS por 10 min, finalmente se hizo la desorción de la muestra en un CG-EM. (Hyšpler et al., 2000)

La acetona presente en el aliento humano fue determinada por Deng et al., (2004). En un vial de 8 mL se agitó por 10 min en modo Headspace 1 mL de disolución del derivatizante de acetona (clorhidrato de hidroxilamina O-2,3,4,5,6-(pentafluorobencil), PFBHA) y una fibra de PDMS/DVB. Se hizo una curva de calibración por estándar interno introduciendo la fibra con el derivatizante en Bolsas Tedlar que contenían N<sub>2</sub> y diferentes concentraciones de acetona a 40 °C por 4 min. Para la muestra de aliento exhalado se introdujo la fibra con el derivatizante PFBHA dentro una Bolsa Tedlar con la muestra por 4 min a 40 °C. Para ambos procedimientos: la curva de calibración y la muestra, la fibra se desorbió en un CG-EM.

En un estudio (Ulanowska et al., 2011) donde se analizaron muestras de aliento de personas sanas (n=23) y de personas con *H. pylori* (n=6) por MEFS-CG-EM, se determinó la presencia de gases endógenos: isobutano, 2-butanona y acetato de etilo, en el aliento de personas con *H. pylori*, en comparación con las muestras de aliento de los voluntarios sanos, donde estuvieron ausentes. En la Tabla 3 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los analitos identificados. La toma de muestra de aliento se hizo con ayuda de un automuestreador que es capaz de regular el CO<sub>2</sub> y controlar la repetibilidad de la exhalación del voluntario; se llenó una bolsa Tedlar de capacidad de 1 L de aliento, con una jeringa para gases se transfirieron 10 mL de muestra a un vial de 20 mL con tapa de teflón, y se introdujo una fibra de Carboxen/PDMS y se extrajo durante 15 min posteriormente se desorbió en el CG-EM.

Tabla 3. Características de los analitos.

Analito	Isobutano	2-butanona	Acetato de etilo
MM (g/mol)	58.1	72.1	88.1
Pto. Fusión (°C)	-160	-87	-84
Pto. Ebullición (°C)	-12	80	77
Densidad (g/mL)	2.06	0.85	0.9
Apariencia	gas licuado	líquido	líquido
Color	-	incoloro	incoloro
Solubilidad	agua	alcohol/agua	alcohol/éter/acetona
CAS	75-28-5	78-93-3	141-78-6
Estructura			

## **2.4. Recolección de muestra**

El procedimiento analítico tiene varios pasos: muestreo, preparación de muestra, separación, cuantificación, evaluación estadística y decisión; más del 80% del tiempo de análisis es dedicado a los pasos de muestreo y preparación de muestra. En algunos casos se deben incluir pasos adicionales como la recolección y el almacenamiento de muestra.

El principal desafío durante el muestreo de aliento humano es el transporte y el almacenamiento del gas de aliento exhalado para la conservación de la composición original de la muestra. Se han propuesto diferentes tipos de recipientes para el muestreo y almacenamiento de aliento, como recipientes de acero inoxidable, tubos adsorbentes, o bolsas de polímero.

### **2.4.1. Bolsa Tedlar**

Un recipiente utilizado para coleccionar muestras de aliento son las bolsas de muestreo Tedlar que están hechas de un material químicamente inerte a una amplia gama de compuestos, y resiste hasta cierto punto la permeación de gases y la adsorción de moléculas de analito en su superficie. Las bolsas de Tedlar se pueden reutilizar para más recolecciones de aliento, pero antes de su reutilización, las bolsas deben evacuarse completamente, limpiar y enjuagar con aire purificado o nitrógeno (P Paredi et al., 2003).

### **2.4.2. Bolsa FlexFoil PLUS**

En un estudio (Mochalski et al., 2009) donde se comparó cinco diferentes materiales de recipientes de almacenamiento de aliento (Nalophan, Tedlar transparente, Tedlar de capa negra, Teflón y FlexFoil) se determinó que las bolsas Flex Foil son la mejor opción para almacenar los compuestos volátiles del aliento hasta por 24 horas. Además, debido a sus paredes fuertes y rígidas, las bolsas FlexFoil son relativamente resistentes al estrés mecánico y como resultado al efecto de envejecimiento o desgaste.



En la Tabla 4 se presentan algunas metodologías que han utilizado este tipo de recipientes de almacenamiento para muestras de aliento.

Tabla 4. Metodologías para el análisis de aliento donde se empleó el uso de contenedores de aliento.

Analito	Bolsa para aliento	Técnica de extracción	Análisis instrumental	Referencia
isopreno	Tedlar	MEFS	CG-EM	Redomir et al., (2000)
acetona	Tedlar	MEFS	CG-EM	Deng et al., (2004)
COVs de aliento	Tedlar	MFES	CG-EM	Buszewski et al., (2009)
Compuestos de azufre	FlexFoil	MEFS	CG	Mochalski et al., (2009)
COVs de aliento	Tedlar	MEFS	CG-EM	Ulanowska et al., (2011)
COVs de aliento	FlexFoil	Cartuchos adsorbentes	CG-EM	Gallego (2016)
COVs de aliento	Tedlar	TD	CGxCG-TOF	Beccaria et al., (2018)
COVs de aliento	FlexFoil		EM-SIFT	Chandran et al., (2019)
Metano/Hidrógeno	FlexFoil		Quintron BreathTracker	Dharmawardana et al., (2020)

## 2.5. Preparación de muestra

El principio de cualquier método de preparación de muestras es la distribución de los analitos entre la matriz de muestra y la fase de extracción. Las técnicas de preparación de muestras se han clasificado de la siguiente manera (Figura 6):

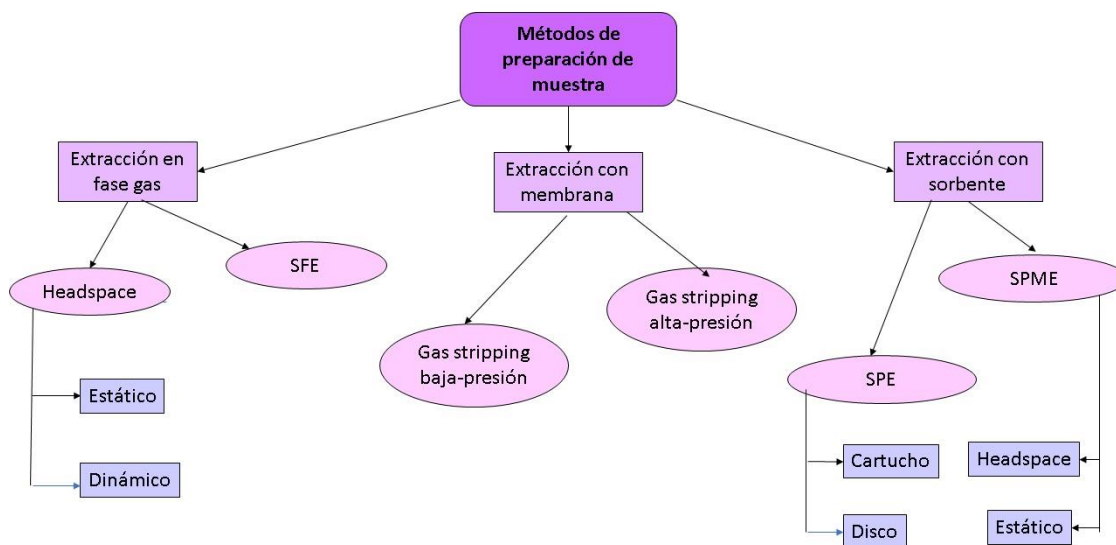


Figura 6. Clasificación de métodos de preparación de muestra sin disolventes. [Modificada de Pawliszyn, 1997]

La extracción con sorbentes se utiliza para extraer compuestos orgánicos de varias matrices, incluyendo, aire, agua y suelo.

### 2.5.1. Microextracción en Fase Sólida

Debido a la concentración traza de los compuestos presentes en el aliento, se requiere una preconcentración como un paso determinante para mejorar la detección de los COVs.

La preconcentración de compuestos volátiles ha sido simplificada con la introducción de la microextracción en fase sólida.

La microextracción en fase sólida (MEFS), es una técnica de preconcentración de muestra para análisis de compuestos volátiles, desarrollada por Janusz Pawliszyn en 1990. El proceso MEFS consiste en dos pasos consecutivos: en el primer paso el recubrimiento de la fibra se expone a la muestra o al headspace de la muestra, lo que hace que los analitos en estudio se separen de la matriz de la muestra. En un segundo paso los analitos concentrados que contiene la fibra se transfieren a un instrumento analítico para su desorción.

#### ***Principio de MEFS***

La técnica de muestreo de MEFS consiste en exponer a la muestra una pequeña cantidad de fase de extracción (recubrimiento), durante un tiempo predeterminado. El proceso se considera completo cuando la concentración del analito alcanza el equilibrio entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra. Las condiciones de equilibrio se pueden describir mediante la ecuación (1), si solo se consideran dos fases (la matriz de muestra y el revestimiento de fibra):

$$C_0 = C_m^\infty V_m + C_f^\infty V_f \quad \text{ec. (1)}$$

Donde  $C_f^\infty$  y  $C_m^\infty$  son las concentraciones de equilibrio en el revestimiento de fibra y la muestra, respectivamente.

El coeficiente de distribución  $K_{fm}$  del analito entre el revestimiento de fibra y la matriz de la muestra se define como:

$$K_{fm} = \frac{C_f^\infty}{C_m^\infty} \quad \text{ec. (2)}$$

Ec. (1) y ec. (2) se pueden combinar y reorganizar en

$$C_f^\infty = C_0 \frac{K_{fm}V_m}{K_{fm}V_f + V_m} \quad \text{ec. (3)}$$

La cantidad de moles extraídos de analito ( $n$ ) por el recubrimiento se puede calcular a partir de la ecuación (4):

$$n = C_f^\infty V_f = C_0 \frac{K_{fm}V_m V_f}{K_{fm}V_f + V_m} \quad \text{ec. (4)}$$

La cantidad de analito extraído en el recubrimiento ( $n$ ) es linealmente proporcional a la concentración de analito en la muestra ( $C_0$ ), es la base analítica para la cuantificación mediante MEFS.

El método de MEFS por headspace (HS) considera tres fases: el recubrimiento de la fibra, la fase gaseosa o headspace y una matriz homogénea que puede ser agua o aire. Durante la extracción, los analitos migran entre las tres fases hasta que se alcanza el equilibrio. La masa total del analito permanece constante, se tiene que

$$C_0 V_m = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_m^\infty V_m \quad \text{ec. (5)}$$

Donde  $C_0$  es la concentración inicial del analito en la matriz,  $C_f^\infty$ ,  $C_h^\infty$  y  $C_m^\infty$  son las concentraciones al equilibrio del analito en el recubrimiento, el headspace y la matriz, respectivamente; y  $V_f$ ,  $V_h$  y  $V_m$  son los volúmenes del recubrimiento, el espacio de cabeza y la matriz de muestra, respectivamente. Si definimos la constante de distribución del recubrimiento/headspace como  $K_{fh} = C_f^\infty / C_h^\infty$  y la constante de distribución de headspace/matriz de muestra como  $K_{hm} = C_h^\infty / C_m^\infty$ , la masa del analito en el recubrimiento  $n = C_f^\infty V_f$ , se puede expresar como

$$n = \frac{K_{fh} K_{hm} V_f C_0 V_m}{K_{fh} K_{hm} V_f + K_{hm} V_h + V_m} \quad \text{ec. (6)}$$

También,

$$K_{fm} = K_{fh}K_{hm} \quad \text{ec. (7)}$$

La constante de distribución de fibra/espacio de cabeza,  $K_{fh}$ , y la constante de distribución de espacio de cabeza/muestra,  $K_{hm}$  se pueden aproximar a  $K_{fm}$  porque el efecto de humedad en el espacio de cabeza puede despreciarse, por lo tanto, la ec. (6) se puede reescribir como

$$n = \frac{K_{fm}V_fC_0V_m}{K_{fm}V_f+K_{hm}V_h+V_m} \quad \text{ec. (8)}$$

La ecuación establece que la cantidad de analito extraído es independiente de la ubicación de la fibra en el sistema, siempre que los volúmenes del recubrimiento de fibra, el espacio de cabeza y la muestra se mantengan constantes.

Para el desarrollo del método de MEFS se consideran las variables controlables (Figura 7):

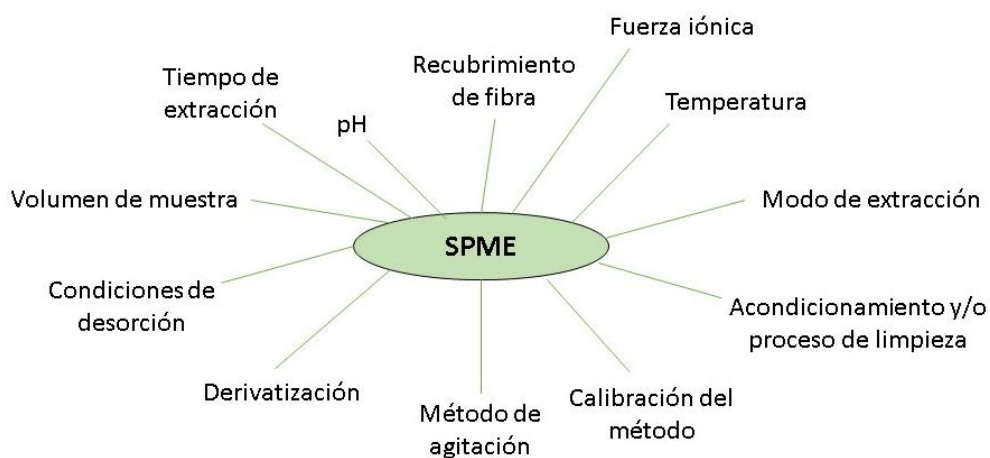


Figura 7. Parámetros típicos considerados en MEFS para su desarrollo y optimización. [Modificada de Pawliszyn, 1997]

**Recubrimiento de fibra**

Los recubrimientos de fibra para MEFS se pueden clasificar principalmente en cuatro categorías: por el tipo de recubrimiento, por el espesor del recubrimiento, por polaridad y por el proceso de extracción que puede ser absorbente o adsorbente. En la Tabla 5 se muestra una lista de fibras comercialmente disponibles.

Tabla 5. Tipos de recubrimientos de fibra para MEFS disponibles comercialmente.

Tipos de recubrimiento	Mecanismo de extracción	Polaridad
PDMS 7 $\mu\text{m}$	Absorbente	No polar
PDMS 30 $\mu\text{m}$	Absorbente	No polar
PDMS 100	Absorbente	No polar
PA 85 $\mu\text{m}$	Absorbente	Polar
PEG 60 $\mu\text{m}$ (Carbowax)	Absorbente	Polar
CarbopackZ-PDMS 15 $\mu\text{m}$	Adsorbente	Dual
PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$	Adsorbente	Dual
Carboxen-PDMS/DVB 55 $\mu\text{m}$ / 30 $\mu\text{m}$	Adsorbente	Dual
Carboxen-PDMS 85 $\mu\text{m}$	Adsorbente	Dual

[Tabla tomada de Shirey, 2012]

La selección de un recubrimiento de fibra apropiado es el primer paso en el desarrollo de la MEFS. Los dos tipos de recubrimiento principalmente utilizados son: el polidimetilsiloxano (PDMS), que es un recubrimiento líquido y el poli(acrilato) (PA) que es un recubrimiento cristalino sólido. Los analitos se extraen en PDMS y PA vía absorción. Los demás recubrimientos: PDMS-DVB (divilbenceno), Carbowax-DVB y Carboxen-PDMS, son mezclas de recubrimientos, en las que la fase primaria extractante es un sólido poroso, extrayendo a los analitos vía adsorción. La Figura 8 ilustra la etapa inicial y la etapa de equilibrio/estado estacionario del proceso de extracción: adsorción y absorción para recubrimientos de MEFS.

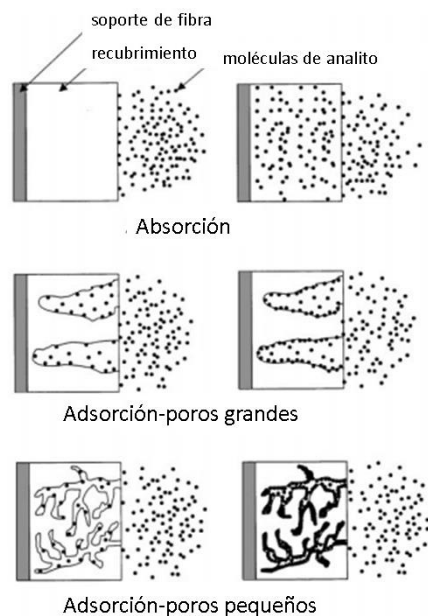


Figura 8. Comparación de los mecanismos de extracción: adsorción y absorción. Los diagramas de lado izquierdo ilustran el estado inicial. Los diagramas de lado derecho ilustran el estado estacionario. [Tomada de Górecki, et. al., 1999]

Independientemente de la naturaleza de un recubrimiento, las moléculas de analito inicialmente se unen a su superficie. Ya sea que migren a la parte central del recubrimiento o permanezcan en su superficie depende de la magnitud del coeficiente de difusión de un analito en el recubrimiento (Górecki, et. al., 1999).

Para análisis de aliento se ha recomendado, con base a trabajos previos, las fibras recubiertas con Carboxen/PDMS (75  $\mu\text{m}$ ) (Hyšpler et al., 2000; Buszewski et al., 2009; M. Ligor et al., 2009) para extraer muestras de aliento exhalado, también se ha usado Carboxen/ PDMS (65  $\mu\text{m}$ )(Martinet al., 2010; Amann et al., 2007).

### **Recubrimiento Carboxen-PDMS**

El Carboxen es un tamiz molecular de carbono, este tipo de recubrimiento de fibra es adsorbente y se desarrolló para extraer analitos volátiles y pequeños. En términos de peso molecular, Carboxen retiene analitos con un peso molecular desde los 35 g/mol. Debido a que los poros son cónicos, los analitos de masa molecular más grandes también se pueden retener en la mayor parte de los poros. La Figura 9 muestra un esquema de un poro cónico en una partícula de Carboxen.

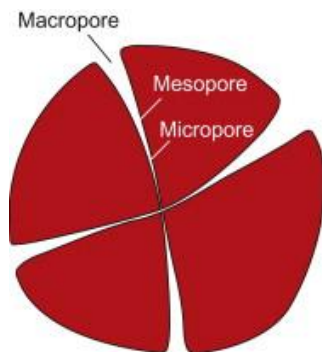


Figura 9. Dibujo de partícula de Carboxen, ilustrando el rendimiento del poro.[Tomada de Shirey, 2012]

El poro tiene una gran abertura cerca de la superficie que se estrecha a medida que penetra más profundamente en la partícula, así el flujo de gas puede entrar en un poro y expulsar el analito por la otra abertura. Esto es posible cuando el analito se calienta y se mueve más rápidamente.

La fase no polar más común es el PDMS. PDMS se usa comúnmente en la fabricación de columnas para CG. Este polímero es altamente reticulado y es térmicamente estable. El PDMS es un buen material de extracción, aunque no tiene una gran afinidad por los analitos polares.

Los recubrimientos adsorbentes como lo es Carboxen-PDMS extraen a los analitos mediante atrapamiento físico. La retención del analito depende del tamaño del analito y del diámetro de los poros. La superficie del adsorbente interactúa con los analitos, por enlaces  $\pi$ - $\pi$ , puentes de hidrógeno o interacciones de Van Der Waals.

La capacidad de un adsorbente para retener analitos depende de varios factores. Estos factores incluyen el área superficial total, la porosidad y el tamaño de los poros. Los macroporos son principalmente poros superficiales y tienen aberturas con diámetros de  $>500 \text{ \AA}$ . Los mesoporos tienen aberturas en el rango de 20 a  $500 \text{ \AA}$ , mientras que los microporos tienen de 2 a  $20 \text{ \AA}$ .

Para la preparación de fibras Carboxen-PDMS y fibras DVB-PDMS, las partículas se suspenden en PDMS comercial de alto peso molecular. Este material se retícula rápidamente y sirve como adhesivo para retener las partículas. La Figura 10 muestra un esquema de las fibras Carboxen-PDMS. Una imagen real ampliada de partículas

de Carboxen suspendidas en PDMS muestra que las partículas de Carboxen son esféricas y se observan múltiples capas de partículas de carbono. (Shirey, 2012)

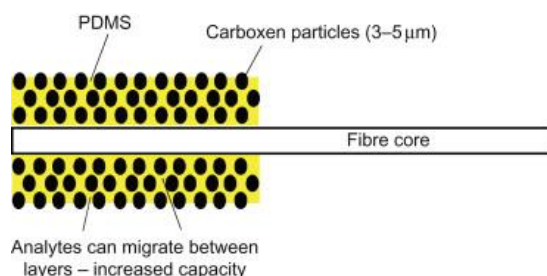


Figura 10. Dibujo de una fibra Carboxen-PDMS. [Tomada de Shirey, 2012]

**Modo de extracción**

Hay tres modos básicos de extracción en MEFS (Figura 11): inmersión directa (ID), extracción de headspace (HS) y extracción protegida por membrana.

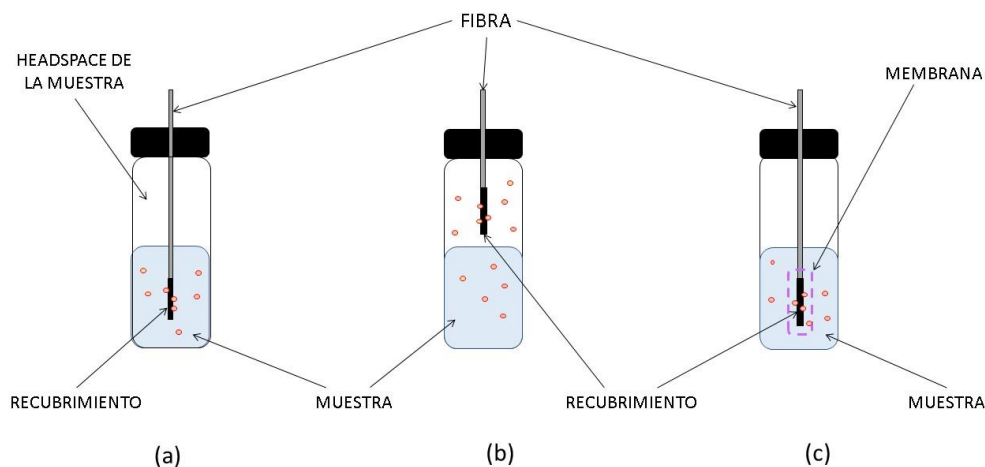


Figura 11. Modos de operación de MEFS: (a) inmersión directa; (b) MEFS headspace; y (c) MEFS protegida por membrana. [Modificada de Pawliszyn, 2012]

La selección del modo de extracción debe considerar la matriz de la muestra, la volatilidad de los analitos y su afinidad por la matriz. Estos criterios se ilustran en la Tabla 6.



Tabla 6. Criterios para la selección del modo de muestreo.

Modo de muestreo	Propiedades de los analitos	Matrices
inmersión directa	volatilidad media a baja	muestras gaseosas, líquidas
headspace	volatilidad alta a media	líquidos, sólidos
protección con membrana	volatilidad baja	muestras complejas

[Tabla modificada de Pawliszyn, 1997]

En el modo de extracción de espacio de cabeza (Figura 11b), la fibra se coloca en el espacio de cabeza por encima de la matriz de la muestra. Para una difusión favorable, se requiere que los analitos sean volátiles. La extracción de headspace puede evitar eficazmente la interferencia de macromoléculas y es preferida debido a los tiempos de equilibrio rápidos.

### ***Técnica de agitación***

Se pueden utilizar varios métodos de agitación en MEFS, dependiendo del tipo de aplicación. En la Tabla 7 se encuentran los métodos de agitación más comunes.

Tabla 7. Métodos de agitación en MEFS.

Método	Ventajas	Desventajas
estático (no agitación)	simple, muestras gaseosas	solo analitos volátiles y HS-SPME
agitación magnética	equipo común, buen rendimiento	requiere barra de agitación en el vial
agitación intrusiva	muy buen rendimiento	difícil sellar la muestra
vortex	buen rendimiento, no se necesita barra en el vial	tensión en agua y fibra, solo para volúmenes pequeños
sonicación	tiempos muy cortos de extracción	ruidosa, calienta la muestra

[Tabla modificada de Pawliszyn, 1997]

La eficacia de la técnica de agitación determina los tiempos de equilibrio de muestras acuosas.

En modo **Headspace**, muchos de los analitos están en el headspace resultando en tiempos de extracción relativamente rápidos, incluso cuando no se usa agitación. Sin embargo, en muchos casos, se requiere la agitación para facilitar el transporte de masa entre el volumen de la muestra acuosa y la fibra.

### ***Condiciones de desorción***

La temperatura del inyector y la velocidad del flujo cerca de la fibra determina el tiempo de desorción. Los compuestos volátiles son totalmente removidos del recubrimiento aplicando altas temperaturas.

### ***Volumen de muestra***

El volumen de la muestra debe seleccionarse con base en la estimación de la constante de distribución.

Para una alta sensibilidad en extracción por headspace, el volumen de la fase gaseosa debe ser minimizado. Compuestos muy volátiles preferirán acumularse en el headspace, si el headspace es grande resultará en una pérdida de sensibilidad.

### ***Tiempo de extracción***

El objetivo de MEFS es alcanzar el equilibrio de distribución del sistema. El tiempo de equilibrio es definido como el tiempo después del cual la cantidad de analitos extraídos permanece constante y corresponde a la cantidad de extracción al tiempo infinito.

## **2.6. Cromatografía**

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC por sus siglas en inglés, define a la cromatografía como un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida.

La interacción entre las fases dependerá principalmente del tipo de fases estacionarias y móviles.

La selectividad del método cromatográfico se puede obtener mediante el uso de un detector que medirá una propiedad física o química de los compuestos de interés y excluirá todos los demás componentes que pueden estar presentes en la muestra.

### **2.6.1. Cromatografía de gases**

En la cromatografía de gases, la fase estacionaria puede ser un sólido, como se usa a menudo en el análisis de gases, o un líquido de alto punto de ebullición que puede recubrirse en el interior de la pared de la columna. Mientras que la fase móvil siempre es un gas, generalmente hidrógeno, helio o nitrógeno. Dado que estos gases son todos relativamente inertes. Para el análisis de muestras gaseosas y muy volátiles, la cromatografía de gases es la única técnica adecuada. (Coning & Swinley, 2019)

Un cromatógrafo de gases funciona de la siguiente manera. Un gas acarreador inerte (fase móvil) fluye continuamente desde un gran cilindro de gas a través del puerto de inyección, la columna y el detector. El flujo del gas se controla cuidadosamente para garantizar tiempos de retención reproducibles y minimizar la deriva y el ruido del detector. La muestra se inyecta en el puerto de inyección caliente, donde se vaporiza y se transporta a la columna (fase estacionaria). La muestra se reparte entre las fases móvil y estacionaria, y se separa en componentes individuales según las presiones de vapor. Después de la columna, el gas y la muestra pasan por un detector. Este dispositivo mide la cantidad de muestra y genera una señal eléctrica. Esta señal va a un sistema/integrador de datos que genera un cromatograma (el registro escrito del análisis). En la mayoría de los casos, el sistema de manejo de datos integra automáticamente el área de pico, realiza cálculos e imprime un informe con resultados cuantitativos y tiempos de retención.(Mc Nair & Miller, 2009)

La Figura 12 muestra las partes básicas de un cromatógrafo de gases simple: gas acarreador, control de flujo, inyector, columna, detector y sistema de datos.

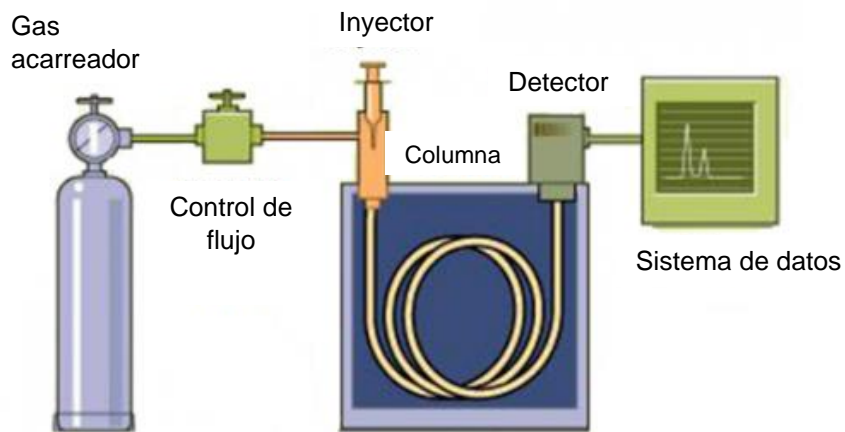


Figura 12. Esquema de un cromatógrafo de gases. [Modificada de DCTech 2015]

### 2.6.2. Sistema acoplado CG-EM

La cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG-EM) es la técnica analítica más común para la identificación y cuantificación de sustancias orgánicas en matrices complejas. Es la combinación de dos potentes técnicas analíticas. El cromatógrafo de gases que separa los componentes de una mezcla, y el espectrómetro de masas que brinda información para la identificación estructural de cada componente.

La alta eficiencia de la separación por cromatografía de gases (CG) así como la alta capacidad de identificación de la espectrometría de masas (EM) hacen de CG-EM el método más común utilizado para medir concentraciones bajas de COVs presentes en el aliento humano.

### 2.7. Espectrometría de masas

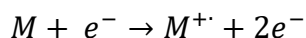
La espectrometría de masas es una técnica instrumental analítica, a menudo utilizada con el fin de determinar estructuras de compuestos orgánicos.

A diferencia de otras técnicas instrumentales, las muestras orgánicas sujetas al análisis de espectrometría de masas sufren una fragmentación destructiva. Sin

embargo, se puede obtener respuesta con tan solo un nanogramo ( $10^{-9}$  gramos) de muestra (Thompson, 2018).

Un espectrómetro de masas consta de una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que funcionan en condiciones de alto vacío. (Gross, 2004).

Actualmente la fuente de iones más utilizada en los sistemas acoplados CG-EM es la ionización electrónica (Figura 13) que consta de una cámara caliente que se mantiene a alto vacío, donde el analito gaseoso se introduce a través de un orificio de muestra. Después, se utiliza un filamento caliente para la emisión termoiónica de los electrones, que se producen con una energía de 70 electronvoltios (eV). Posteriormente, los electrones se aceleran por medio de una diferencia de potencial. La colisión entre un electrón acelerado y la molécula gaseosa del analito M provoca su ionización al ion radical  $[M]^+$ , el llamado ion molecular. Durante este proceso, una parte de la energía cinética del electrón acelerado, que es mayor que la energía de ionización de M, se transfiere al ion molecular naciente. Por lo tanto, la alta energía interna resultante de la capa abierta  $[M]^+$  ion induce su fragmentación extensa. Los iones fragmento del producto así formados, como los iones  $[M]^+$  que eventualmente sobrevivieron finalmente se extraen a través de un orificio de salida al analizador.



Los espectros de masas obtenidos por ionización electrónica son altamente reproducibles, lo que permite generar grandes bibliotecas de espectros para una identificación automatizada y confiable de compuestos (Smoluch, et. al., 2019).

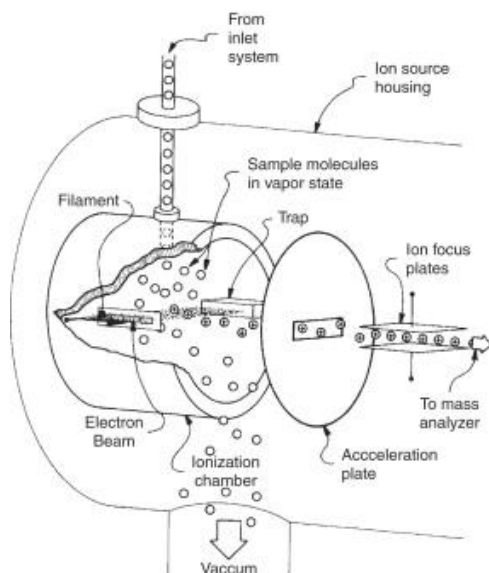


Figura 13. Esquema de una fuente de iones por ionización electrónica.[Tomada de Sparkman, 2011]

Los tipos de analizadores básicos empleados para la espectrometría de masas analítica se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Analizadores de masas.

Tipo	Acrónimo	Principio
Tiempo de vuelo	TOF	Tiempo de dispersión de un haz de iones pulsados; separación por tiempo de vuelo
Sector magnético	B	Desviación de un haz de iones continuo; separación por impulso en el campo magnético debido a la fuerza de Lorentz
Cuadrupolo lineal	Q	Haz de iones continuo en campo de cuadrupolo de radiofrecuencia lineal; separación debido a la inestabilidad de las trayectorias de los iones
Trampa de iones de cuadrupolo lineal	LIT	El haz de iones continuo proporciona iones para atraparlos; almacenamiento y finalmente, separación en un campo de cuadrupolo de radiofrecuencia lineal mediante excitación resonante
Trampa de iones de cuadrupolo	QIT	Iones atrapados; separación en campo tridimensional de cuadrupolo de radiofrecuencia por excitación resonante
Resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier	FT-ICR	Iones atrapados en campo magnético (fuerza de Lorentz); separación por frecuencia de ciclotrón, detección de imagen y transformación de Fourier de una señal transitoria
Trampa orbital	trampa orbital	Oscilación axial en campo eléctrico no homogéneo; detección de frecuencia después de la transformación de Fourier de una señal transitoria

El espectrómetro de masas de cuadrupolo es el más popular y se caracteriza por un filtro de masas no magnético, que se compone de cuatro varillas sólidas dispuestas simétricamente a lo largo de la dirección del flujo de iones (Figura 14). Las varillas del cuadrupolo son sometidas tanto a una radiofrecuencia (RF) como a un voltaje de corriente continua (CC). Una vez que los iones positivos se aceleran en el campo cuadrupolar, experimentan la influencia de la radiofrecuencia aplicada y la corriente continua. Dependiendo de la relación RF/CC y los valores de la relación  $m/z$ , los iones adquirirán una oscilación estable o inestable a medida que intentan atravesar el campo cuadrupolar. Los iones que tengan los valores  $m/z$  adecuados tendrán una oscilación estable y atravesarán con éxito el campo y se detectarán. Los iones con oscilaciones inestables chocarán con las varillas del cuadrupolo y no serán detectados.

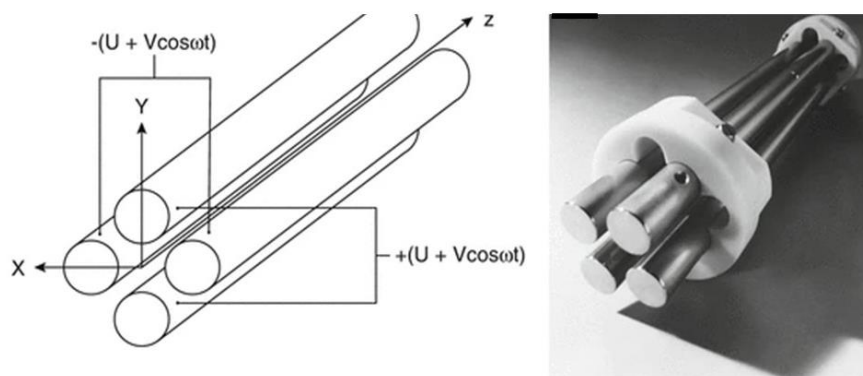


Figura 14. Esquema y fotografía de analizador de masas de cuadrupolo lineal. [Tomada de Thompson,2018]

Es posible cambiar rápidamente la relación RF/DC para escanear un espectro de masas o seleccionar relaciones específicas RF/DC para medir repetidamente algunas especificaciones (monitoreo de iones seleccionados). El rango de masas logrado con el espectrómetro de masas de cuadrupolo depende de la energía de la radiofrecuencia aplicada a las varillas de cuadrupolo. En algunos instrumentos, la salida del generador de RF es suficiente para permitir exploraciones de hasta 10 000 unidades de masa atómica (Thompson, 2018).

## 2.8. Analisis multivariados

Existen dos enfoques diferentes para analizar datos estadísticos multivariados. Uno está basado en los datos y las herramientas estadísticas se ven como algoritmos que se aplican para obtener los resultados. Otro enfoque es el basado en modelos. Los datos disponibles se ven como realizaciones de variables aleatorias y se asume un modelo estadístico subyacente (Brereton, 2003).

Los principales métodos quimiométricos aplicados al análisis exploratorio, la clasificación y la calibración son: el análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR), respectivamente. Para problemas no lineales, los mapas autoorganizados (SOM), la clasificación de vectores de soporte (SVC) y la regresión de vectores de soporte (SVR) son métodos quimiométricos que se aplican actualmente (Bona, 2018).

### 2.8.1. Analisis discriminante por minimos cuadrados parciales (PLS-DA)

PLS-DA es un método de reconocimiento de patrones supervisado. En el método PLS-DA, una matriz X está relacionada con una matriz Y que contiene información sobre la clase de muestra. Los valores de Y están codificados por cero o uno y esto indica la clase de la muestra.

La principal ventaja de PLS-DA es la capacidad de predicción. Los resultados pronosticados del método PLS-DA están limitados por un valor de limite, los valores por encima de ese limite indican que las muestras pertenecen a la clase modelada, y valores pronosticados por debajo de este límite indican que esas muestras no pertenecen a la clase modelada.

PLS-DA se ha empleado para la autenticación de aceites de soja transgénicos y no transgénicos; para la evaluación del origen geográfico y genotípico del café Arábica; para la clasificación de los aceites de canola, girasol, maíz y; en la detección y



caracterización de fraudes en carne bovina por adiciones de ingredientes no cárnicos; para la autenticación del origen del aceite de oliva virgen; como método de cribado para la detección simultánea de adulterantes en leche cruda; para el cribado de raíces de yuca durante el deterioro fisiológico poscosecha; en la predicción del origen geográfico de las mantequillas, para predecir la clase de acidez de los aceites de oliva virgen extra; evaluar la contaminación de la leche por Salmonella; en datos sensoriales, en la evaluación de la adulteración y fraude del aceite de oliva virgen extra; y en la predicción de la identidad de grasas y aceites por su composición de ácidos grasos, triacilglicerol y composiciones volátiles (Bona, 2018).

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Propuesta de un método mediante microextracción en fase solida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (MEFS-CG-EM), como una alternativa a la prueba de aliento ya existente, para la identificación de gases endógenos (isobutano, 2-butanona y acetato de etilo) en el aliento humano relacionados con la *Helicobacter pylori*.

#### **3.2. Objetivos particulares**

- Desarrollar un método, como una alternativa a la prueba de aliento ya existente, para la identificación de compuestos orgánicos volátiles en el aliento humano relacionados con la infección bacteriana de *H. pylori*.
- Identificar las diferencias de perfil de aliento, entre una persona sana y una persona con infección bacteriana.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La bacteria *Helicobacter pylori* es un patógeno potencial para el ser humano, se reconoce como un importante agente causal en enfermedades gastroduodenales, como gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y asociado al linfoma de mucosas de tejido linfoide. Por lo que se requiere un método que sea rápido, no invasivo y preciso para la detección temprana de gases endógenos (isobutano, 2-butanona y acetato de etilo) producidos por *H. pylori*. La MEFS como una técnica de preconcentración, seguido de CG-EM, es una posible alternativa a los métodos ya existentes debido a la preconcentración de compuestos a nivel de trazas por MEFS y a la eficiencia de separación, selectividad, sensibilidad e identificación de CG-EM.

## 5. HIPÓTESIS

Si se propone y desarrolla una metodología para la identificación de compuestos endógenos (isobutano, 2-butanona y acetato de etilo) presentes en el aliento humano producidos por la infección bacteriana de *Helicobacter pylori* basada en microextracción en fase sólida (MEFS) seguida del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), permitirá la detección de la infección de una manera rápida, precisa, sencilla y que no es invasiva con el paciente.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 6.1. Materiales e instrumentos

- Balanza analítica Sartorius mod. CP124S
- Vortex M37615 (Thermolyne, EUA)
- Parrilla de agitación magnética (Super Nuova, Thermo Scientific, EUA) y agitador magnético
- Fibras: Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB) con espesor de película de 65  $\mu\text{m}$  y Carboxen/Polidimetilsiloxano (Carboxen/PDMS) con espesor de película 75  $\mu\text{m}$  (Supelco, EUA). Las fibras se acondicionaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Soporte de fibras MEFS y guía de inyección para fibras MEFS (Supelco, EUA)
- Material de vidrio: Matraces aforados Pyrex de 2, 5, 10 y 25 mL; Pipeta volumétrica de 5 mL; Pipetas Pasteur de tallo largo y Viales de vidrio transparente de 11 mL con tapón horadado y septa de silicón/teflón 13 mm (CRS, EUA)
- Micropipeta 100-1000  $\mu\text{L}$  (Accumax, EUA)
- Bolsa para muestrear aliento FlexFoil PLUS (1 L) mod. 269-01-PP con boquilla individual (SKC, EUA)

#### 6.1.1. Limpieza de material

Se realizó el siguiente procedimiento de limpieza a las Bolsas FlexFoil nuevas y después del análisis de aliento.

##### ***Limpieza de Bolsa FlexFoil PLUS nueva y después del análisis de aliento***

1. Abrir la válvula que está integrada en la Bolsa FlexFoil
2. Llenar con  $\text{N}_2$  la Bolsa al 75% de su capacidad
3. Cerrar la válvula
4. Esperar 30 segundos
5. Abrir la válvula
6. Presionar la bolsa con las manos para retirar el  $\text{N}_2$  que se introdujo

7. Cerrar la válvula
8. Repetir pasos 1 a 7 de 3 a 5 veces

En ambos casos se realizó este procedimiento de limpieza, para verificar que no quedaron residuos de compuestos volátiles del aliento, después de la limpieza se realizó MEFS-CG-EM de la Bolsa con N<sub>2</sub>, a este procedimiento se le llamó “Blanco de Bolsa”.

### ***Limpieza de material de vidrio***

El material de vidrio se enjuagó una vez con metanol, se lavó tres veces con detergente líquido Extran® y se enjuagó con abundante agua. Adicionalmente, para evitar la formación de sales, se enjuagó con agua desionizada dos veces. El material no volumétrico se colocó en la mufla durante una hora a 550 °C, al finalizar el material de vidrio se almacenó con teflón y aluminio en la boquilla.

## **6.2. Reactivos y disolventes**

Estándares: Acetato de etilo (99.97%) Baker (México), acetato de propilo (90%) Fluka AG. (Suiza) y 2-butanona grado HPLC (99.5%) Aldrich (EUA).

Disolvente: Metanol HPLC Tecsiquim (México).

Nitrógeno cromatográfico (99.998%) INFRA (México).

Solución Extran® para limpieza de material de vidrio.

## **6.3. Condiciones cromatográficas**

Cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) con detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés), inyector PTV y columna capilar CPPoraBond Q (estireno-divinilbenceno polímero poroso), 25 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 3.0

µm de grosor de película (Agilent Tech). Gas acarreador hidrógeno, flujo 1 mL/min. Temperatura del inyector 250 °C, en modo splitless (1 min). Temperatura del detector 300 °C. Programa de temperatura: Temp. inicial 40 °C (0 min), incremento de 10°C/min hasta 300 °C (1 min).

Cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (5973), inyector split/splitless en modo splitless (0.5 min) a 250 °C y columna capilar CPPoraBond Q (estireno-divinilbenceno polímero poroso), 25 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 3.0 µm de grosor de película (Agilent Tech). Gas acarreador Helio, flujo de 1 mL/min. Programa de temperatura fue: Temp. inicial 40 °C (1 min), incremento de 13 °C/min hasta 300 °C (3 min). Temperatura de la línea de transferencia y de la fuente de ionización, 280 °C y 220 °C respectivamente. Electroionización 70 eV y analizador másico un cuadrupolo. Para la identificación de compuestos se realizó el análisis en modo SCAN (40-550 m/z) y se compararon los espectros obtenidos con los de la base de datos del Instituto Nacional de Estandarización y Tecnología de EUA (NIST, por sus siglas en inglés).

## 6.4. Metodología

### 6.4.1. HS-MEFS-CG de COVs atribuidos a *H. pylori*

Para determinar el tiempo de retención de los compuestos relacionados con la infección de *H. pylori* se realizó la MEFS con una disolución estándar de 2-butanona y acetato de etilo. El procedimiento para determinar el tiempo de retención fue estudiado previamente en el laboratorio.

HS-MEFS-CG. En un vial de 11 mL se coloca 5 mL de disolución estándar (2-butanona y acetato de etilo) con un agitador magnético, el vial se cierra con un tapón horadado y una septa de teflón. El vial se coloca en la parrilla de agitación durante 5 min (tiempo de equilibrio) a 1200 rpm y temperatura ambiente (21±1 °C). Una vez transcurrido el tiempo de equilibrio se perfora el septum con la aguja de la jeringa que contiene en su interior la fibra PDMS/DVB y se expone la fibra en el espacio de cabeza durante 1 min

(tiempo de extracción). Una vez concluido el tiempo de extracción, se retrae la fibra y se desorbe en el inyector del cromatógrafo de gases durante 1 min. Se estableció que se mantendría la fibra 10 min en el inyector para tenerla lista para un siguiente análisis (Figura 15).

De acuerdo con los resultados previos de concentración y con el procedimiento arriba descrito, se evaluó el tiempo de extracción 5, 15 y 30 min, con una disolución estándar de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Con estas condiciones también se evaluó acetato de metilo y acetato de propilo, como estándar interno (EI). El análisis se realizó por triplicado.

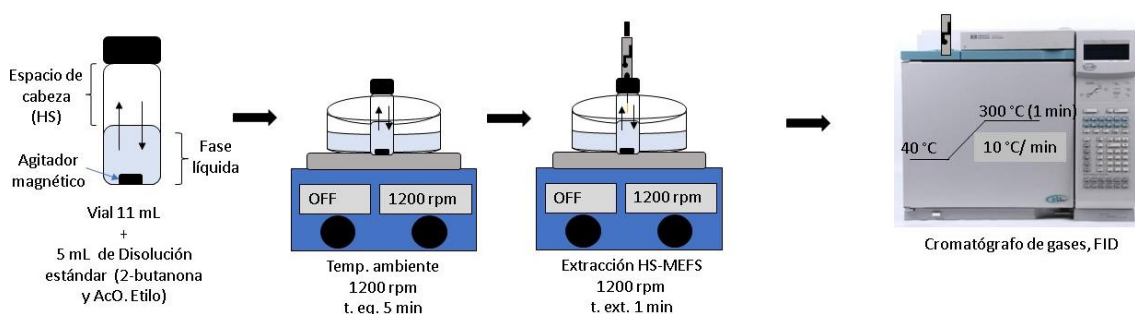


Figura 15. HS-MEFS-CG de COVs atribuidos a *H. pylori*.

#### 6.4.2. MEFS-CG de aliento

##### 6.4.2.1. Muestras

En este primer muestreo se dispuso de 7 voluntarios sanos de los cuales 4 fueron hombres y 3 mujeres. Para cada voluntario se tomó 4 muestras ( $n=4$ ). La muestra se recolectó en dos días consecutivos, una por la mañana y una por la tarde (Figura 16). Obteniéndose 28 muestras en total. En la Tabla 9 se describen características de los voluntarios.



Tabla 9. Características de voluntarios de muestra de aliento.

Clave	Sexo	Edad (años)	Dieta
MA3	M	66	Tradicional
MA4	M	67	Vegetariana
MJ5	M	25	Tradicional
HA2	H	72	Tradicional
HA3	H	75	Tradicional
HJ2	H	35	Tradicional
HJ3	H	32	Tradicional

M: Mujer; H: Hombre; A: Adulto/Adulta; J: Joven



Figura 16. Esquema de recolección de un voluntario.

#### 6.4.2.2. Procedimiento para el muestreo

Para el muestreo de aliento se utilizó Bolsas FlexFoil de capacidad de 1 L, previamente limpias antes de la toma de muestra. Con el objetivo que el muestreo fuera repetible y confiable se hizo la siguiente secuencia de pasos:

1. Conectar la boquilla a la válvula de propileno de la Bolsa FlexFoil (Figura 17)

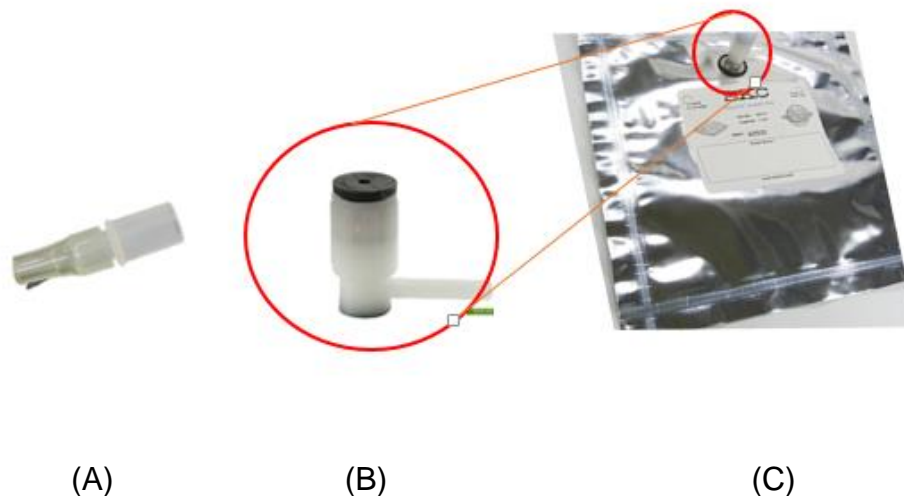


Figura 17. Boquilla para toma de aliento (A); Válvula de propileno (B); Bolsa FlexFoil PLUS (C).

2. Verificar que la válvula este cerrada
3. Abrir la válvula para contener la muestra de aliento
4. Toma muestra de aliento (Figura 18)

El voluntario sentado inhala y exhala 2 veces lo más profundo que pueda para ventilar los pulmones y exhalar la mayor cantidad de aire. Una tercera vez inhala y mantendrá la inhalación tapando su nariz con el dedo pulgar e índice, asegurándose que la exhalación solo sea por la boca a través de la boquilla.

5. Cerrar la válvula
6. Retirar la boquilla de la válvula
7. Realizar análisis de aliento por MEFS-CG



Figura 18. Toma de aliento a voluntario.

#### **6.4.2.3. Procedimiento de MEFS-CG para aliento**

Para establecer el tiempo de extracción para MEFS se realizó con el aliento de un voluntario sano, también se examinó la limpieza de la Bolsa FF previa al análisis.

Una vez que se tomó la muestra de aliento, se realizó la extracción insertando la fibra precargada con estándar interno (EI). Se estudió 5 y 10 minutos de extracción. Posteriormente del tiempo de extracción la fibra se retrae y se lleva al CG para su análisis. (Figura 19 A).

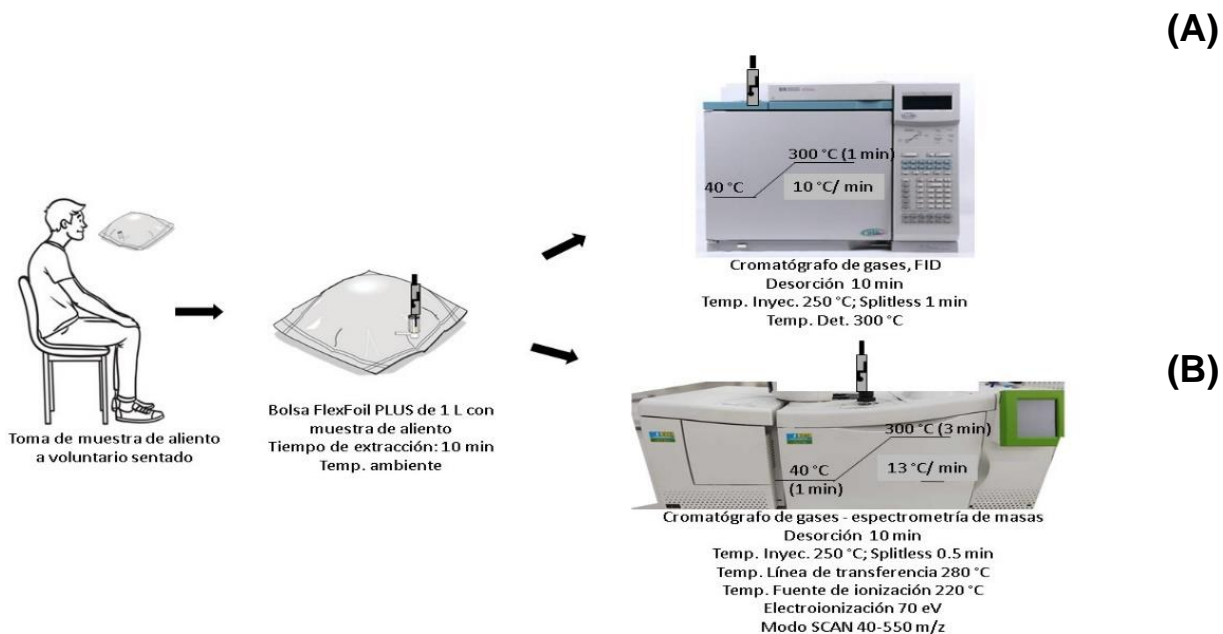


Figura 19. Análisis de aliento con MEFS-CG (A); Análisis de aliento con MEFS-CG-EM (B).

### 6.4.3. MEFS-CG-EM de aliento

De acuerdo con los resultados previos se decidió no realizar el análisis cuantitativo, por lo que para el análisis de aliento utilizando MEFS-CG-EM no se utilizó EI. Se utilizó la fibra de Carboxen/PDMS y el muestreo de aliento se hizo como se describió en la Sección 6.4.2.2 con 10 min de extracción (Figura 19 B).

#### 6.4.3.1. Muestras

En este segundo muestreo se contó con 15 voluntarios sanos de los cuales 6 fueron hombres y 9 mujeres. Para cada voluntario se tomaron dos muestras ( $n=2$ ). Las muestras se recolectaron dos veces durante el día: por la mañana y por la tarde. Obteniéndose 30 muestras en total. En la Tabla 10 se muestran características de los voluntarios.

Tabla 10. Características de los voluntarios.

Clave	Sexo	Edad (años)	Dieta
MA1	M	70	Tradicional
MA2	M	75	Tradicional
MA3	M	66	Tradicional
MA4	M	67	Vegetariana
MJ1	M	38	Tradicional
MJ2	M	35	Vegana
MJ3	M	36	Vegana
MJ4	M	21	Tradicional
MJ5	M	25	Tradicional
HA1	H	72	Tradicional
HA2	H	72	Tradicional
HA3	H	75	Tradicional
HJ1	H	22	Tradicional
HJ2	H	35	Tradicional
HJ3	H	32	Tradicional

M: Mujer; H: Hombre; A: Adulto/Adulta; J: Joven

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. HS-MEFS-CG de COVs atribuidos a *H. pylori*

**Tiempo de extracción.** Para evaluar el tiempo de extracción 1, 5, 15 y 30 min, se utilizó una disolución estándar de 2-butanona y acetato de etilo a 10  $\mu\text{g/L}$ . Los resultados se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 20. Se observó que la mayor extracción de 2-butanona y acetato de etilo es a 5 y 15 min, respectivamente. Sin embargo, se eligió 5 min de extracción porque la extracción de 2-butanona disminuye a tiempos mayores.

Tabla 11. Resultados de evaluación de tiempo de extracción de HS-MEFS-CG.

C (ppb)	t ext (min)	n	Á prom 2-butanona	%CV	Á prom AcO etilo	% CV
10	1	4	967	25	1349	23
10	5	4	4183	27	7984	21
10	15	4	3602	27	9885	29
10	30	4	1446	17	2533	19

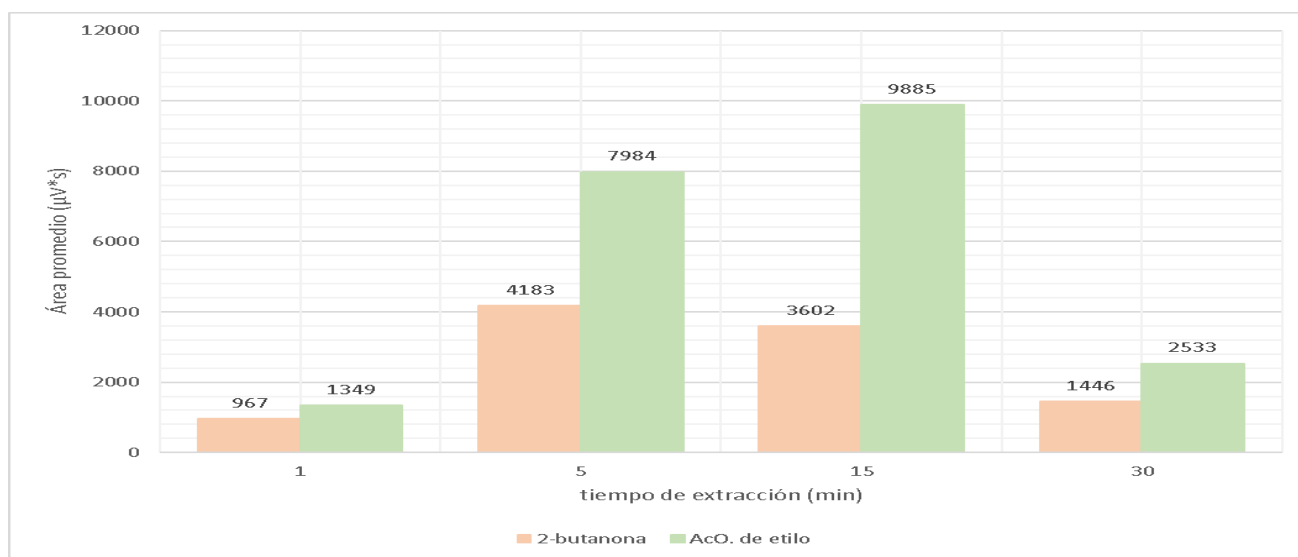


Figura 20. Perfil de extracción de solución estándar a 10  $\mu\text{g/L}$ .

**Estándar interno.** La propuesta de utilizar un estándar interno fue debido a que se observó variabilidad en la MEFS ( $\%CV > 20\%$ ) y porque se había establecido cuantificar los COVs relacionados con *H. pylori*. Se evaluaron acetato de metilo y acetato de propilo bajo las mismas condiciones mencionadas en la Secc. 6.4.1. Se observó que la respuesta de acetato de metilo era menor en comparación con la de acetato de propilo (Figura 21), por lo que se seleccionó acetato de propilo como estándar interno.

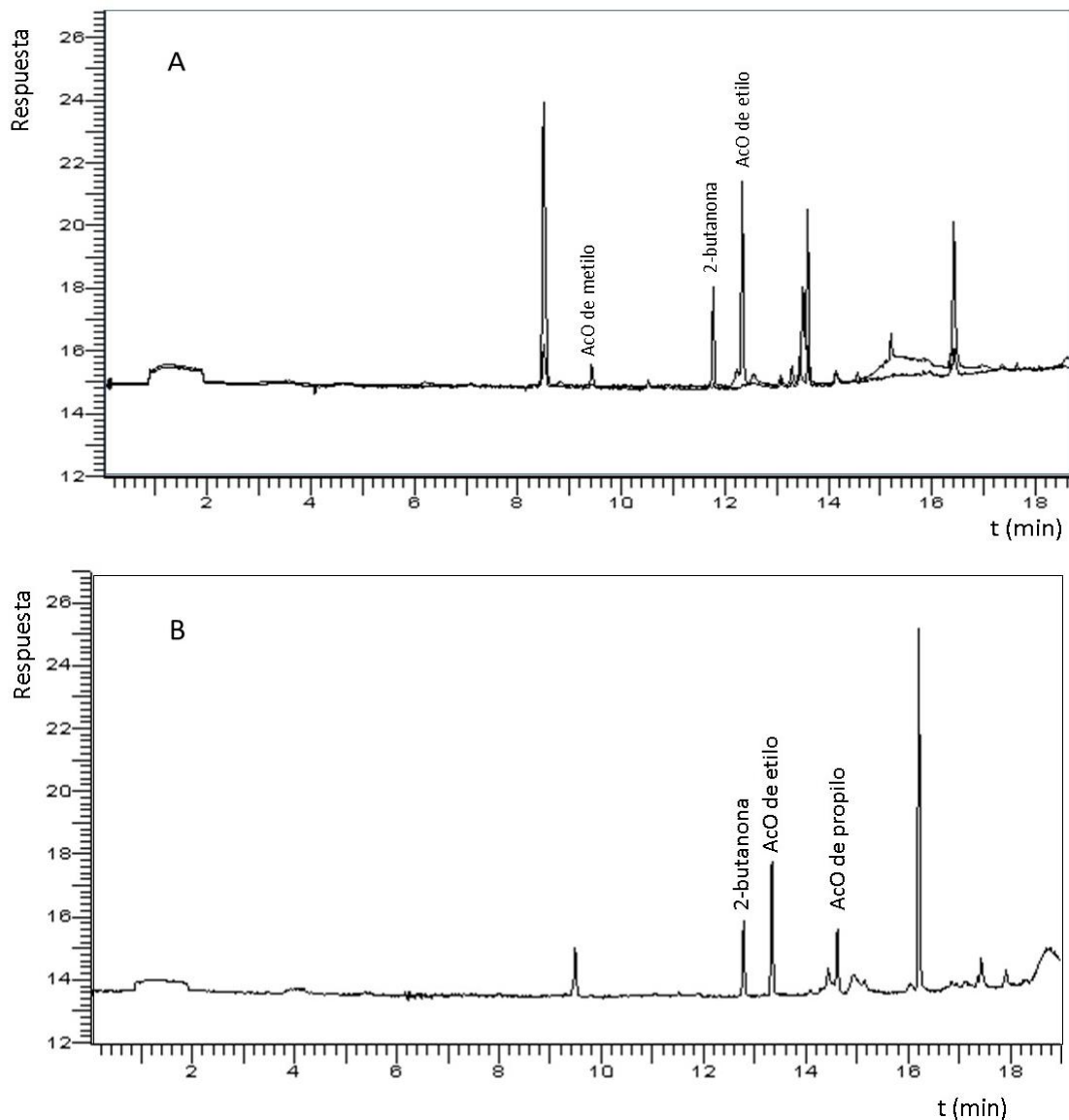


Figura 21. Cromatogramas de disolución estándar y estándares internos: A) acetato de metilo y B) acetato de propilo.

## 7.2. MEFS-CG de aliento

**Tiempo de extracción de aliento.** Para la extracción de aliento se utilizó una Bolsa FlexFoil y se evaluó el tiempo de extracción de 5 y 10 min con las condiciones de MEFS-CG establecidas en la Sección 6.4.2.3. En la Figura 22 se muestran los cromatogramas del análisis y se observó que el área del EI y de los COVs del aliento eran mayores en 10 min de extracción. Por lo que se seleccionó 10 min de extracción para las muestras de aliento.

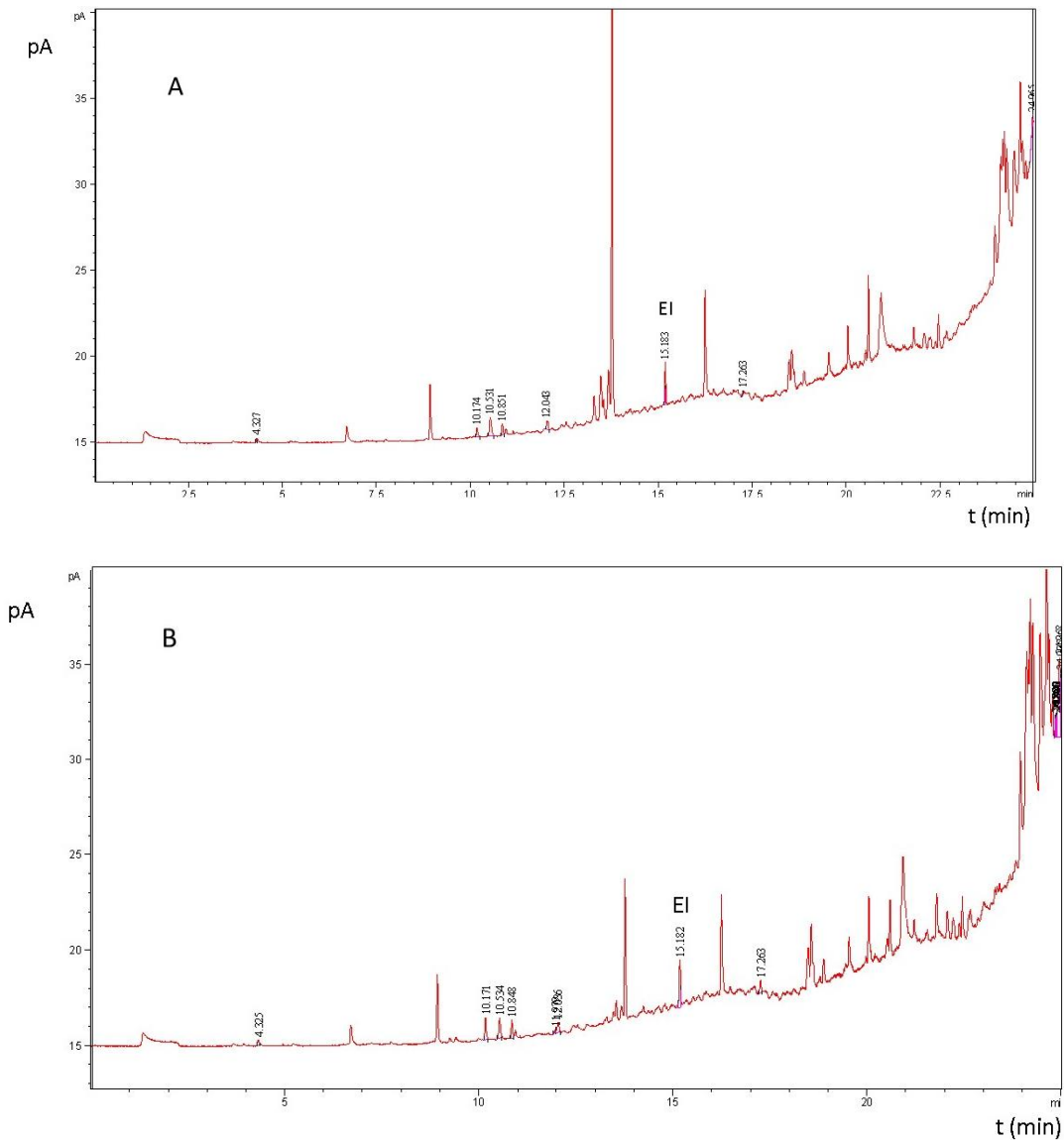


Figura 22. Cromatogramas de evaluación de tiempo de extracción de aliento A) 5 min y B) 10 min.



### 7.3. MEFS-CG-EM de aliento.

Después de establecer las condiciones de MEFS seguida de CG del análisis de aliento y que se probaron en un voluntario sano, se procedió a utilizar MEFS-CG-EM, para identificar los COVs del aliento, especialmente los atribuidos a la infección por *H. pylori*. Este análisis se hizo utilizando una fibra de Carboxen/PDMS, debido a que, este recubrimiento se desarrolló para extraer analitos volátiles y pequeños.

#### ***Análisis de aliento de voluntarios sanos***

Se contó con la participación de 15 voluntarios sanos: 9 mujeres y 6 hombres, entre 21 a 75 años. El muestreo de aliento se realizó en un día por duplicado para cada voluntario: por la mañana y por la tarde. La primera muestra fue recolectada, en la mayoría de los voluntarios, en ayunas o por lo menos 2 horas y media después de su última ingesta de alimentos; y las muestras por la tarde fueron tomadas después de 2 o 3 horas de la ingesta de alimentos. Es importante mencionar que el metabolismo de la ingesta de alimentos es un factor de variabilidad biológica de cada individuo que afecta el análisis de fluidos, entre ellos el aliento, por lo que se trato dentro de lo posible de homogenizar la toma de la muestra de los voluntarios.

En la Tabla 12 se muestran los 43 COVs que fueron identificados en el análisis de aliento. Los compuestos se clasificaron de acuerdo con el grupo funcional: 5 alcoholes, 12 alcanos, 4 alquenos, 2 nitrocompuestos, 2 cicloalcanos, 6 cetonas, 2 clorados, 3 sulfurados, 4 aromáticos, 2 éteres y 1 éster. También se muestra el número de voluntarios donde se identificó el compuesto y su origen: exógeno o endógeno; así como, el ion fragmento que fue utilizado para la obtención de áreas, para el posterior análisis estadístico.

Tabla 12. COVs identificados en muestras de aliento.

#	tr (min)	Compuesto	m/z	Voluntarios (n=15)	origen
1	7.083	etanol	45	15	en
2	7.444	isobutano	43	5	
3	7.520	2-metil-1-propene	41	1	
4	7.706	acetonitrilo	41	7	ex
5	7.828	ciclobutano	41	2	
6	7.921	2-nitropropano	43	2	
7	7.950	butano	43	10	en
8	8.905	acetona	43	15	en
9	9.004	diclorometano	49	13	ex
10	9.196	(s)-(+)-1,2-propanediol	43	1	
11	9.208	2-propanol	45	14	en/ex
12	9.324	dimetilsulfuro (DMS)	62	12	en
13	9.936	1-propanol	59	13	
14	10.186	etileter	59	2	
15	10.204	2-metil-1-propanol	59	1	
16	10.221	2-metilbutano	43	10	
17	10.291	isopreno	67	15	en
18	10.396	2-pentene	55	1	
19	10.477	2-metil-2-butene	70	1	
20	10.553	pentano	43	15	en
21	11.368	2,3-butanodiona	43	1	
22	11.421	triclorometano	83	15	ex
23	11.432	2-butanona	43	15	en
24	11.810	Acetato de etilo	43	15	
25	12.020	metilterbutileter	73	5	
26	12.404	2-metilpentano	43	15	
27	12.562	3-metilpentano	57	14	
28	12.661	benceno	78	15	ex
29	12.748	metilciclopentano	56	12	
30	12.806	hexano	57	15	en
31	13.511	3-hidroxi-2-butanona	45	3	
32	13.621	sulfuro de metilo de alilo	88	4	
33	13.930	sulfuro de 1-propenilo de metilo	73	4	
34	14.448	2-metilhexano	43	1	
35	14.506	3-metilhexano	71	2	
36	14.809	tolueno	91	15	
37	14.954	4-metil-2-pentanona	43	2	
38	15.502	2,2-dimetilhexano	57	1	
39	16.614	ciclohexanona	55	1	
40	16.660	o-xileno	91	3	ex
41	16.922	p-xileno	91	3	ex
42	17.423	2,4-dimetilheptano	43	3	
43	17.813	4-metiloctano	43	3	

en=endógeno

ex= exógeno

En el análisis de aliento de todos los voluntarios se identificaron: etanol, acetona, isopreno, pentano, triclorometano, 2-butanona, acetato de etilo, 2-metilpentano, benceno, hexano y tolueno (Tabla 12). Estos compuestos se encuentran comúnmente en el aliento. El origen fisiológico de estos compuestos en el aliento es diverso, y se pueden asignar a cinco categorías bioquímicas principales: estrés oxidativo, inflamación, metabolismo energético (glucólisis), genética y origen desconocido. Por ejemplo, acetona está asociada a la descarboxilación de acetoacetato, isopreno subproducto del metabolismo del colesterol, pentano como producto del estrés oxidativo y el acetato de etilo es un éster que se encuentra en el citoplasma de todos los eucariotas, incluidos los humanos, así como en varios tipos de alimentos como compuesto natural o como parte de un aditivo.

Algunos compuestos pueden ser confundidos con biomarcadores. Por ejemplo, la detección de acetonitrilo, tolueno y algunos derivados del benceno en el aliento exhalado pueden estar asociados principalmente con el tabaquismo o deberse a otras exposiciones ambientales, como gases contaminantes o tabaquismo pasivo. Además, el origen de los compuestos aromáticos como el p-xileno, el benceno y el 2,5-dimetilfurano aún se desconoce, y se han considerado posibles contaminantes ambientales en informes anteriores.

En una gráfica de los compuestos producidos por *H. pylori*: isobutano, 2-butanona y acetato de etilo (Figura 23) que se identificaron en el muestreo de mañana y tarde de algunos voluntarios, se observó que hay mayor producción de estos compuestos en los análisis de la tarde que en el de mañana. La producción de COVs en el aliento incrementa conforme avanza el día, comparado con la muestra en ayunas. Es importante señalar que las concentraciones de COVs en el aliento exhalado no son constantes y varían dentro de un cierto intervalo.

En las muestras de la tarde de mujeres adultas, se observa mayor producción de acetato de etilo y para el caso de las muestras de hombres adultos, se identificaron los 3 compuestos relacionados a *H. pylori*; uno de los voluntarios tenía antecedentes de *H. pylori* y el otro de una úlcera péptica, que comúnmente es causada por *H. pylori*.

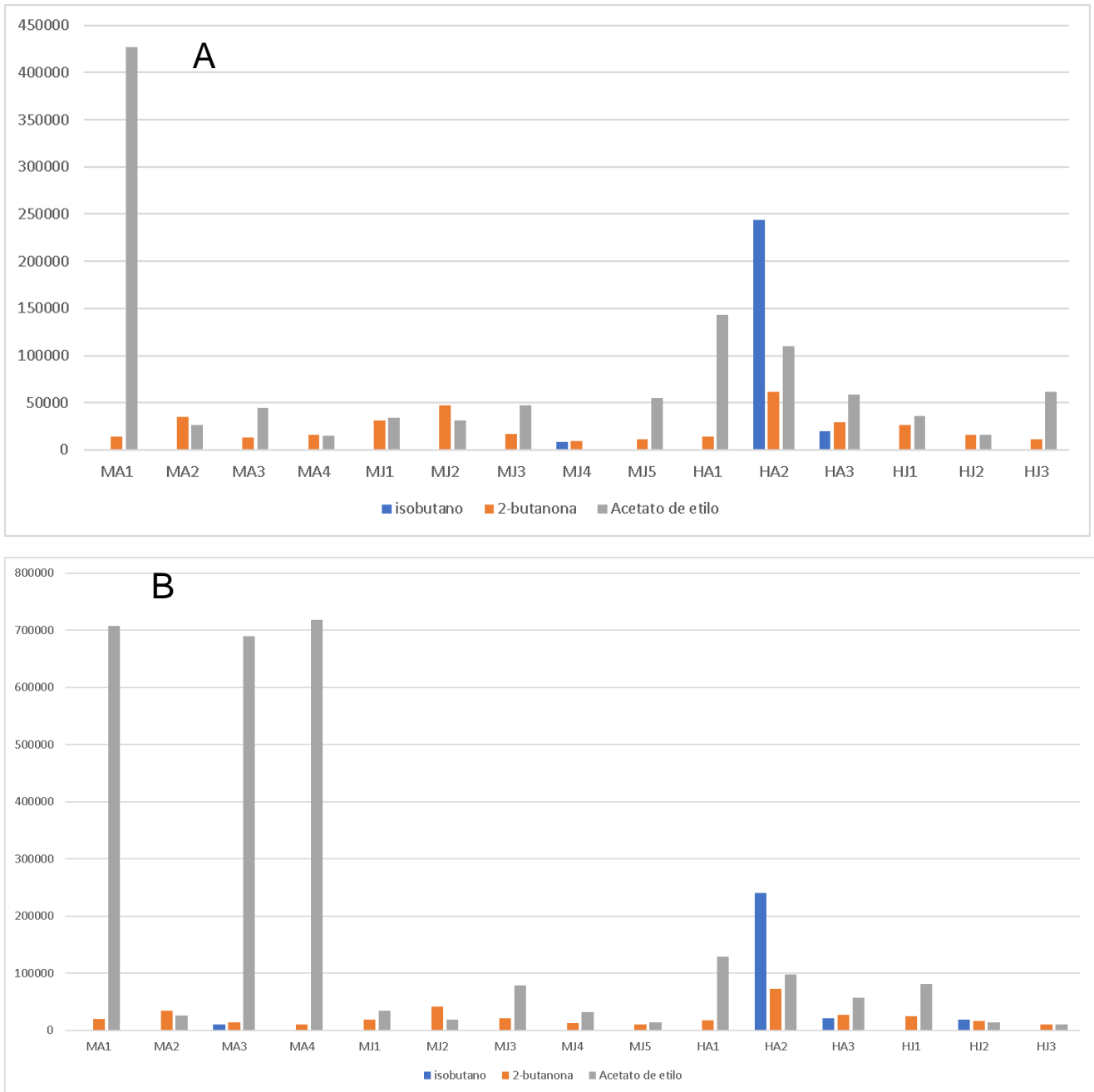


Figura 23. Compuestos producidos por *H. pylori* en muestra de A) la mañana y de B) la tarde.

La Figura 24 muestra el cromatograma iónico total (TIC, por sus siglas en inglés) de una muestra de aliento de un voluntario sano. Se identificaron 22 compuestos que se enlistan en la Tabla 13.

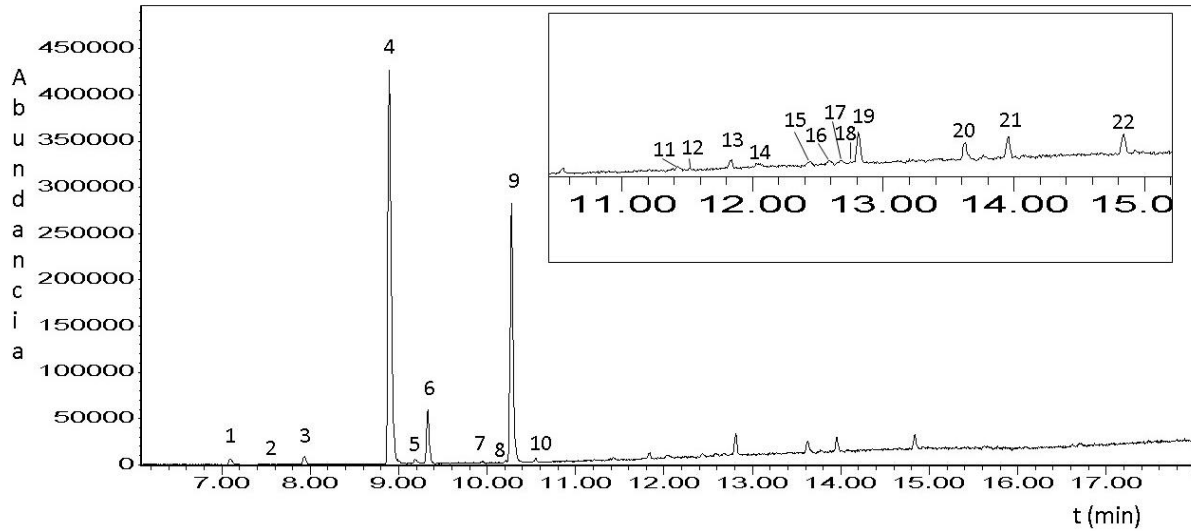
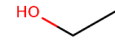




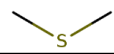
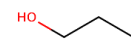


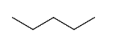


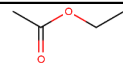
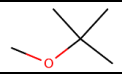
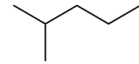
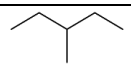


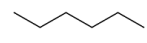
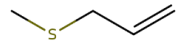

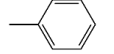


Figura 24. Cromatograma iónico total (TIC) de una muestra de aliento de la tarde de un voluntario sano hombre adulto.

Tabla 13. Identificación de COVs en aliento (n=2).

No. De pico	Tiempo de retenció	Compuesto identificado	Prob.	Match	Estructura	Área	
						1	2
1	7.100	etanol	88.2	927		105445	102489
2	7.415	isobutano	33.3	842		20420	19437
3	7.939	butano	80.4	911		112851	115668
4	8.911	acetona	88.5	977		7428777	7906646
5	9.185	2-propanol	62.1	824		93561	101298
6	9.336	DMS	60.3	971		372013	399452
7	9.918	1-propanol	73.3	659		12257	12354
8	10.209	2-metilbutano	55.4	708		12351	12139
9	10.239	isopreno	5.26	930		1881241	2057644
10	10.524	pentano	70.7	818		25264	29523
11	11.420	triclorometano				7624	5713
12	11.433	2-butanona	16.6	675		27570	29697
13	11.805	Acetato de etilo	89.5	858		56695	58815
14	12.020	metilterbutileter	54.6	759		47841	49360
15	12.410	2-metilpentano	21.5	704		25354	27842
16	12.573	3-metilpentano	23	831		18220	18149
17	12.661	benceno	59.5	840		41798	38300
18	12.731	metilciclopentano	14.2	659		-	12801
19	12.783	hexano	80.9	919		126163	134849
20	13.621	Sulfuro de metilo de alilo	29.4	769		56247	64638
21	13.930	Sulfuro de 1-propenilo de metilo	33.8	743		40855	46320
22	14.804	tolueno	28.2	827		157989	174893


### **Análisis estadístico**

El número de voluntarios no es suficientemente grande para ofrecer conclusiones significativas (15 voluntarios); sin embargo, el número de muestras totales analizadas se consideran suficientes para plantear algunos resultados preliminares. Entre los tratamientos estadísticos (PCA, DA, Análisis de conglomerados, etc.) el PLS-DA se aplica cuando no se tiene un número elevado de muestras y estas tienen demasiadas características; por lo que en este estudio se aplicó el PLS-DA con los datos obtenidos del análisis de aliento de todos los voluntarios.

Se realizó el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) con el fin de clasificar por grupos y encontrar las variables que determinan dicha clasificación. Para el procesamiento de datos se utilizó el software *MetaboAnalyst 5.0* (*MetaboAnalyst*, 2009). Las áreas obtenidas para cada compuesto identificado en la muestra de aliento fueron las variables y para el análisis se consideraron todos los COVs identificados, no solo los atribuidos a *H. pylori*. También se realizó el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), pero este análisis no hizo la discriminación entre grupos (Ver Anexo II).

Se generaron distintas matrices en Excel, con el fin de ser analizadas con el software, eligiendo diferentes Grupos. Cada matriz fue normalizada con el software para la obtención del PLS-DA. La Figura 25 es un ejemplo de una matriz donde los Grupos son: voluntario sano y voluntario con antecedentes de *H. pylori*. Para sano, el voluntario debía tener buen estado de salud respecto enfermedades gastrointestinales y para voluntario con antecedentes de *H. pylori*, se consideró que el voluntario tuviera antecedentes de *H. pylori* o ulcera péptica.

Variables: áreas



Muestra	Grupo	etanol	isobutano	acetona	....	tolueno	4-metil-2-pe	4-metilactan
MA1t	Sano	297722	0	7102788	....	126271	0	0
MA1m	Sano	272024	0	4423699	...	140331	0	0
MJ1t	Sano	72263	0	1725173	....	0	0	0
MJ1m	Sano	165917	0	1639238	....	278987	0	0
HA2m	H. pylori	288881	243823	5248336	....	735623	75805	38036
HA2t	H. pylori	276897	240166	4953577	....	726205	69600	38777
HA3m	H. pylori	102489	19437	7906646	....	174893	0	0
HA3t	H. pylori	105445	20420	7428777	....	157989	0	0
...	....	....	....	....	....	....	....	....
HJ2m	Sano	11304	0	2788676	....	125729	0	0
MJ5t	Sano	38448	0	2317185	....	114701	0	0

H: Hombre; M: Mujer; A: Adulto/Adulta; J: Joven; m: mañana; t: tarde

Figura 25. Matriz para análisis PLS-DA.

La grafica de “scores” (Figura 26) ilustra los resultados obtenidos al aplicar el PLS-DA a las muestras de mañana y tarde de todos los voluntarios. Se observa una clara separación de las muestras de los voluntarios con antecedentes de *H. pylori* y úlcera gástrica de los voluntarios sanos. La agrupación de muestras de voluntarios sanos (triángulos rosas) se representa en la elipse verde generada por el software y la agrupación de muestras de voluntarios con antecedentes de *H. pylori* (círculos verdes) dentro de la elipse rosa generada por el software. Además, la prueba de validación cruzada mostró valores altos de predictibilidad y bondad de ajuste del modelo como lo indican  $R^2$  y  $Q^2$  ( $R^2= 0.7989$ ,  $Q^2= 0.6331$ ). En general,  $R^2$  y  $Q^2$  deben ser  $> 0.5$  para dar un modelo biológico significativo (Li et al., 2017).



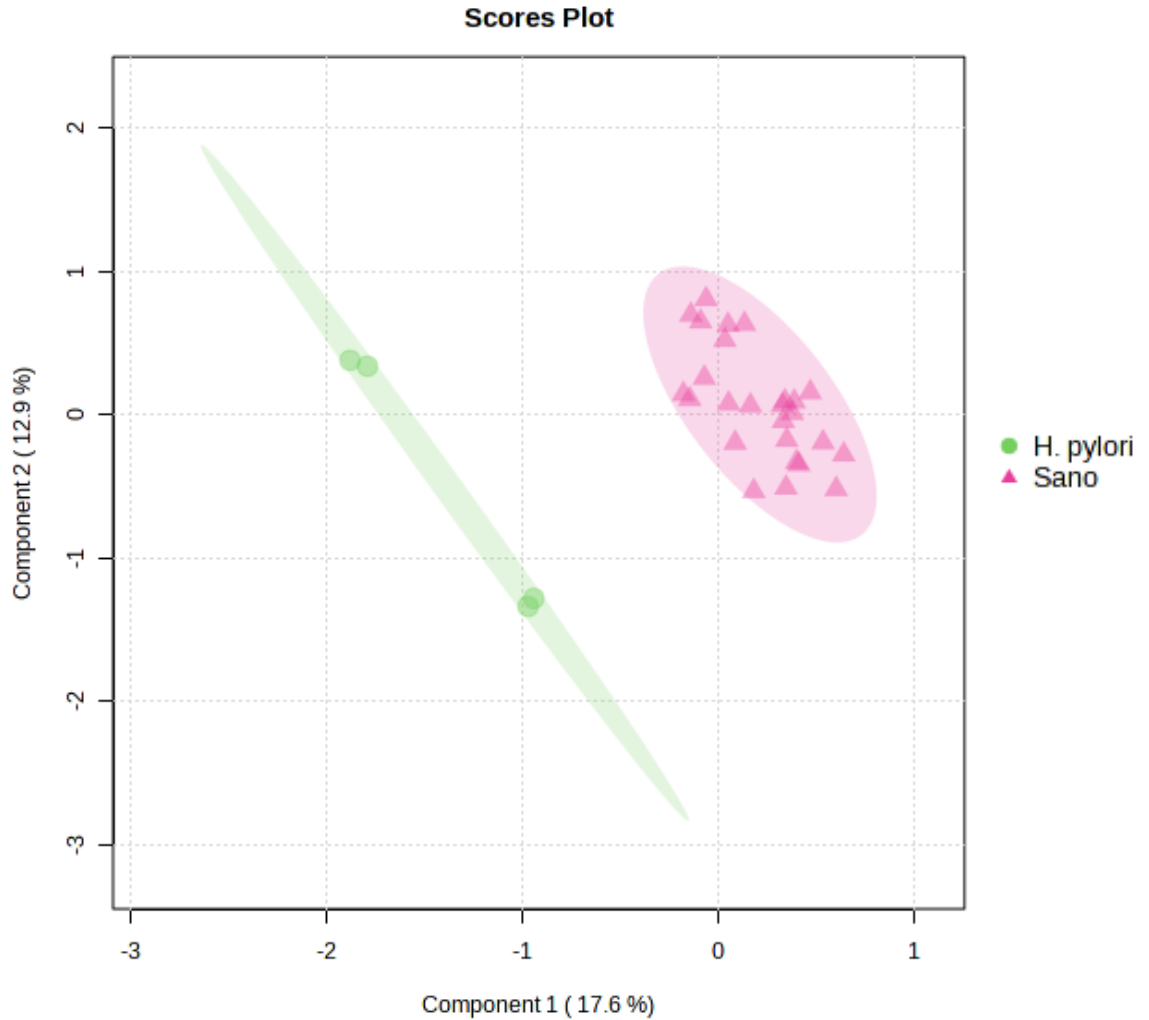


Figura 26. Gráfica de “scores” (PLS-DA) correspondiente a las 30 muestras de aliento de todos los voluntarios.

El gráfico de “loadings” correspondiente al tratamiento de los resultados mediante PLS-DA (Figura 27), muestra los COVs que contribuyen a una mayor discriminación entre grupos, que son los situados en los extremos de la nube de dispersión. Aquellos situados en el centro de la nube de puntos no contribuyen a la clasificación. Los COVs que se han identificado que han experimentado cambios entre el grupo de *H. pylori* y sanos, son: acetona, sulfuro de metil alilo, dimetilsulfuro, butano e isobutano.

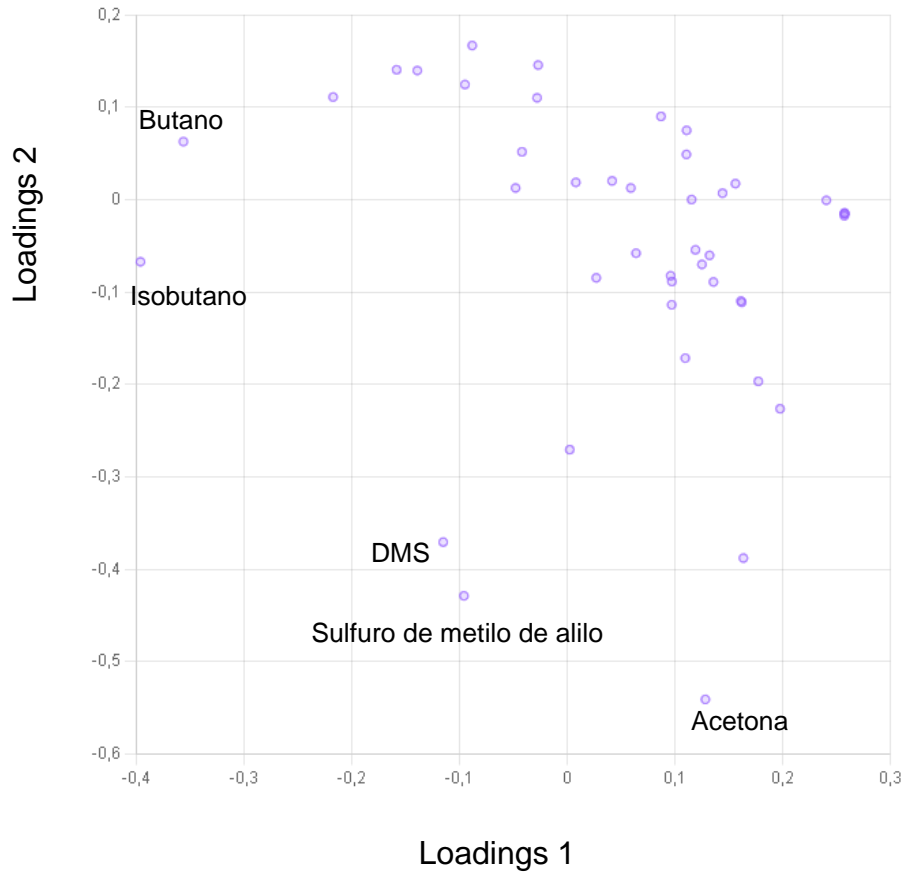


Figura 27. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de *H. pylori* vs voluntarios sanos.

En el análisis PLS-DA, se pueden clasificar los datos de diferentes maneras, dependiendo del Grupo que se seleccione. Se aplicó PLS-DA a las muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. Se observa en la gráfica de “scores” (Figura 28) la clasificación entre Hombre Joven, Hombre Adulto, Mujer Joven y Mujer Adulta. Es decir, se consideró el sexo y la edad de los voluntarios. La prueba de validación cruzada mostró valores de predictibilidad y bondad de ajuste del modelo de  $Q^2=0.041432$  y  $R^2=0.9295$ , los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  deben ser mayores a 0,5, aunque para la bondad de ajuste si es así, para la capacidad predictiva no, por lo que no es un modelo biológico significativo. Sin embargo, como se muestra en el gráfico de “loadings” (Figura 29), los COVs que indica el software que más contribuyen a la discriminación fueron: isobutano, 2,4-dimetilheptano, butano, 2-metil-1-propeno y 4-metiloctano.

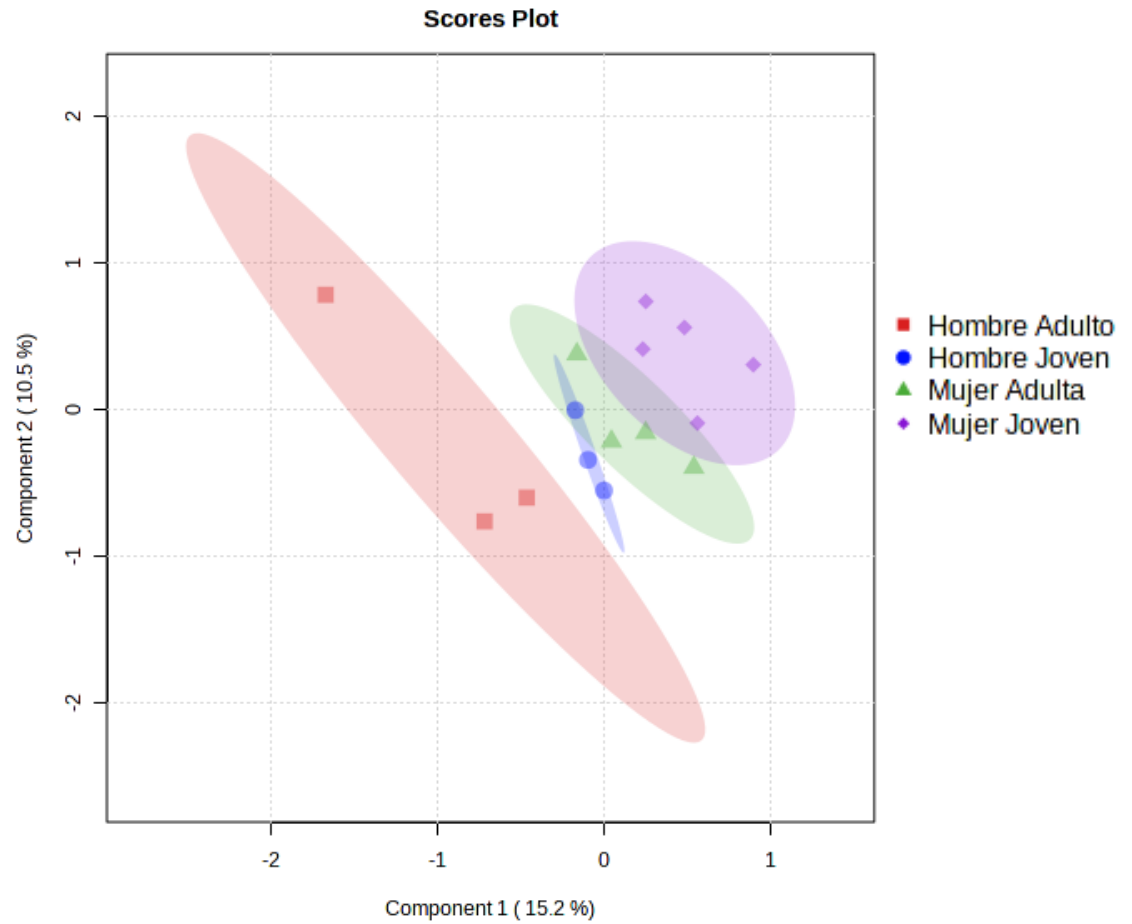


Figura 28. Gráfica de “scores” (PLS-DA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios.

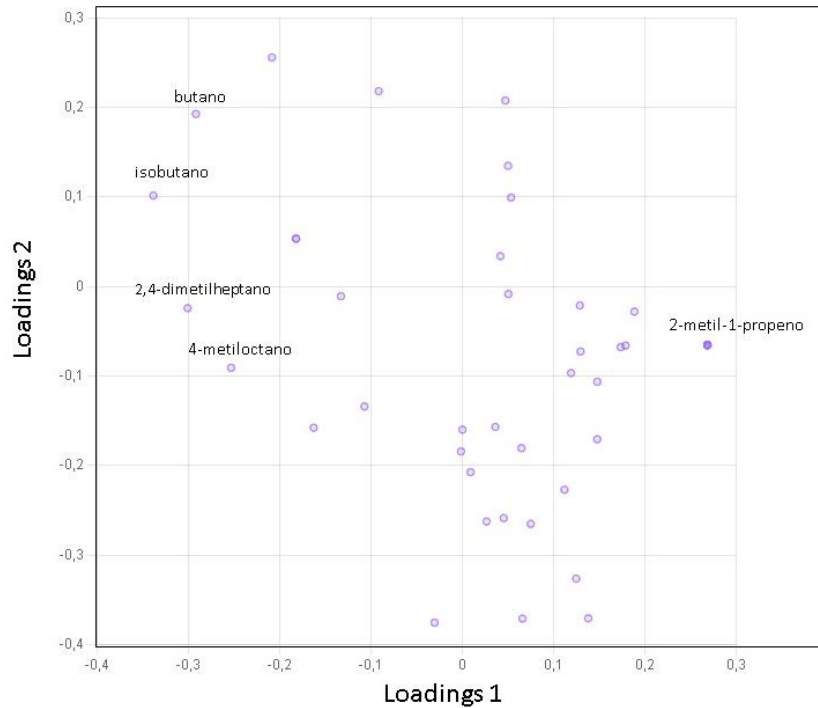


Figura 29. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de Hombre Adulto, Hombre Joven, Mujer Adulta y Mujer Joven.

Se aplicó PLS-DA a las muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios. Se observa en la gráfica de “scores” (Figura 30) la clasificación entre Hombre y Mujer. La prueba de validación cruzada mostró valores de predictibilidad y bondad de ajuste del modelo de  $R^2 = 0.62689$  y  $Q^2 = 0.58688$ . De acuerdo con el gráfico de “loadings” (Figura 31), los COVs que más contribuyeron a la discriminación entre grupos fueron: isobutano, 2,4-dimetilheptano, 2-metilpentano, 3-metilpentano y 4-metiloctano.

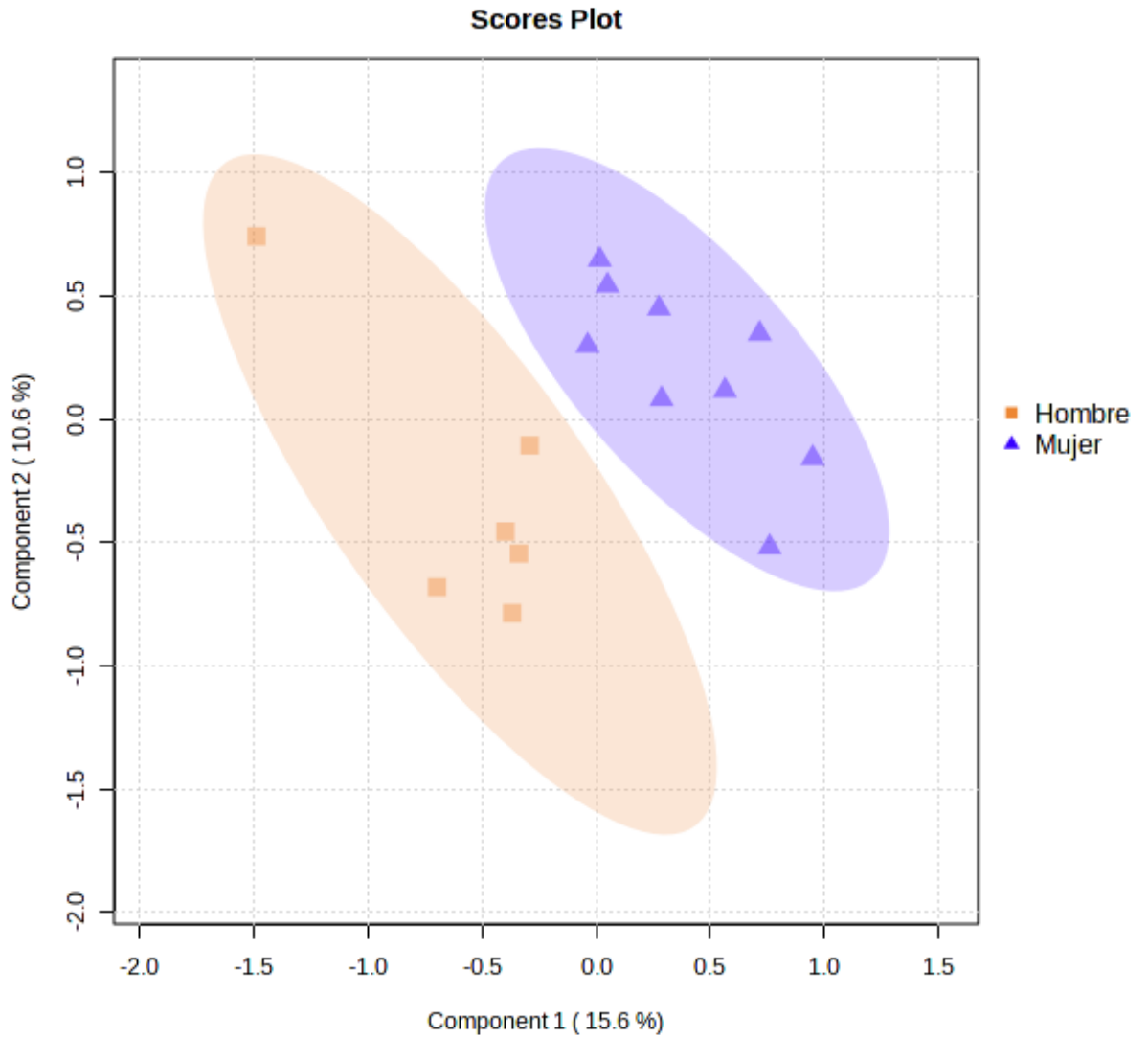


Figura 30. Gráfica de "scores" (PLS-DA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios.

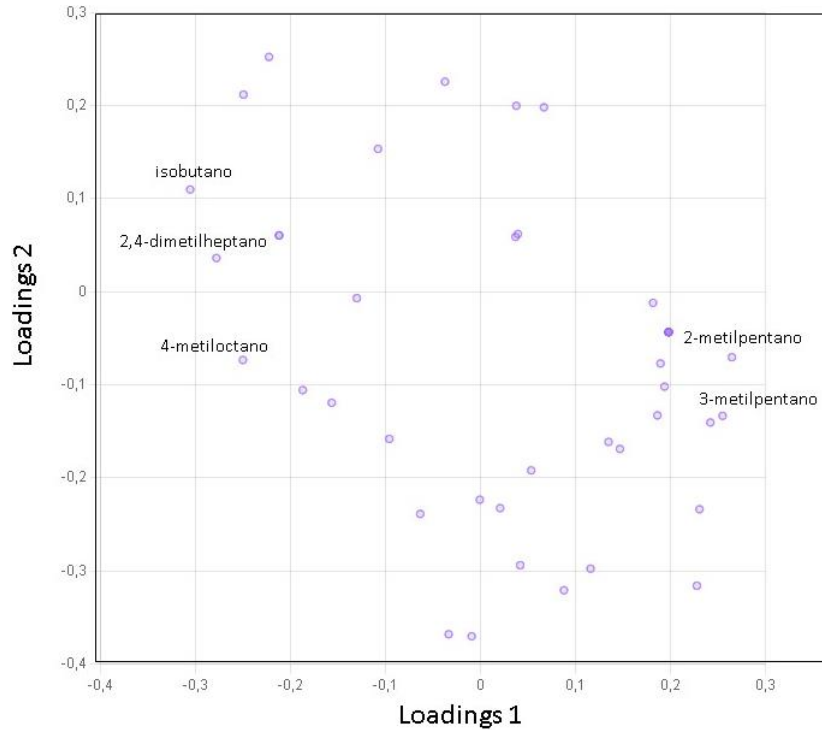


Figura 31. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de Hombre y Mujer.

Otro análisis de PLS-DA utilizando los Grupos: voluntarios con dieta Tradicional y voluntarios con dieta Vegetariana/Vegana se aplicó a las muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios, la clasificación se muestra en la gráfica de “scores” (Figura 32). La prueba de validación cruzada mostró valores de predictibilidad y bondad de ajuste del modelo de  $Q^2 = -0.68979$  y  $R^2 = 0.59479$ , respectivamente. La capacidad predictiva del modelo ( $Q^2$ ) es negativa, lo que significa que el modelo no es predictivo o está sobre ajustado ( Szymańska, et al ). Como se muestra en el gráfico de “loadings” (Figura 33), los COVs que más contribuyeron a la discriminación entre grupos fueron: o-xileno, isobutano, 2,4-dimetilheptano, 2-metilpentano y 2,2-dimetilhexano.

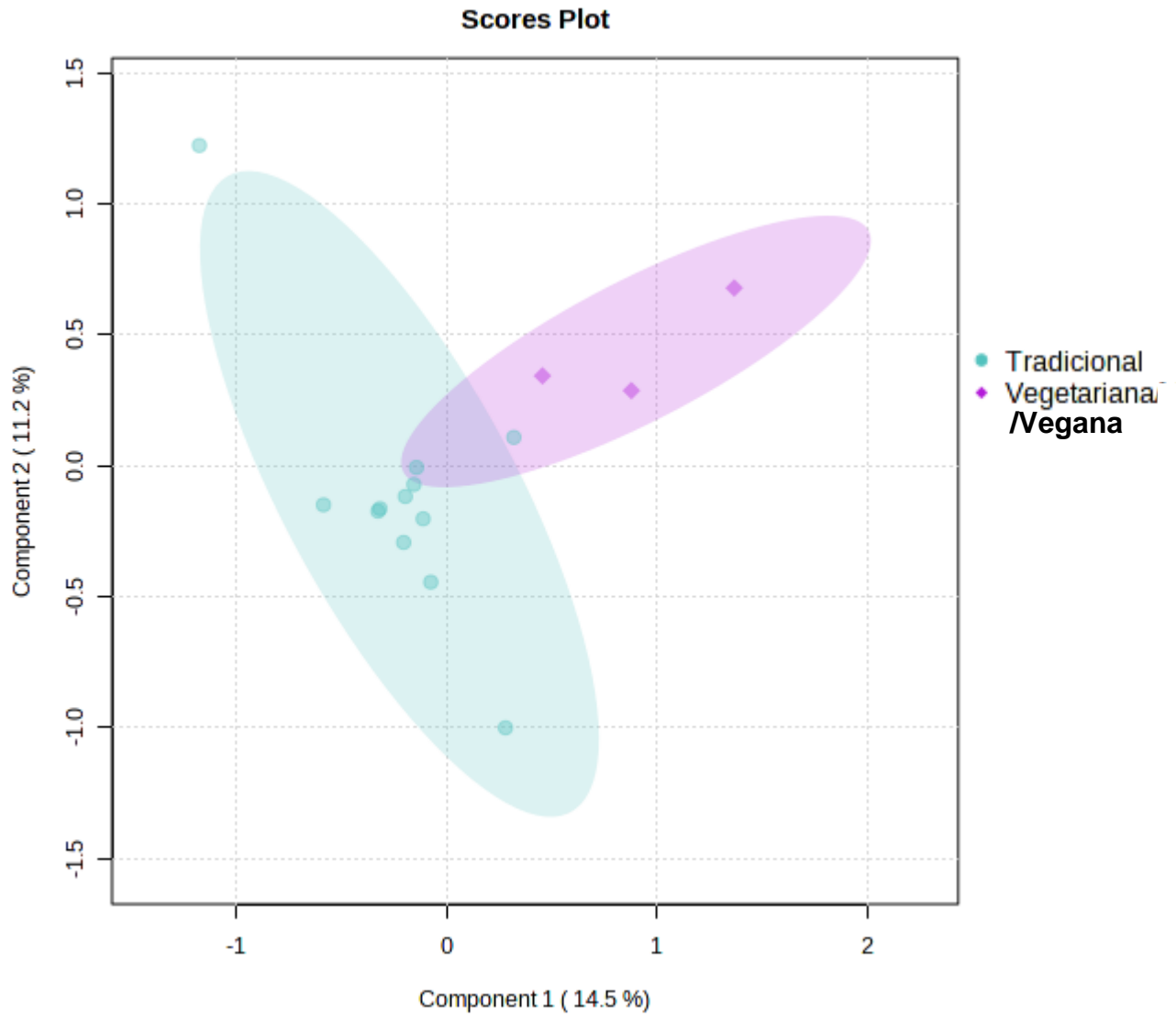


Figura 32. Gráfica de "scores" (PLS-DA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios.

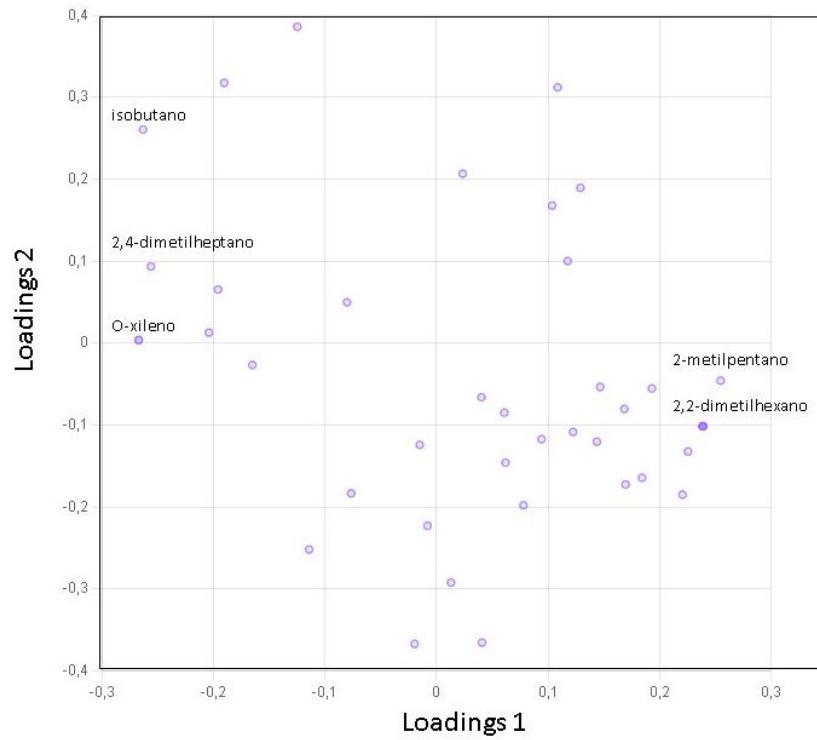


Figura 33. Representación de los “loadings” (PLS-DA) correspondiente a la discriminación de dieta Tradicional y Vegana/Vegetariana.



## 8. CONCLUSIONES

1. El objetivo del proyecto se cumplió al proponer un método por microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (MEFS-CG-EM) para la determinación de gases endógenos producidos por *Helicobacter pylori*: isobutano, 2-butanona y acetato de etilo.
2. La metodología propuesta para la detección de gases endógenos producidos por *H. pylori* es sencilla, rápida, indolora y no requiere que el paciente ingiera una pastilla de urea marcada isotópicamente, a diferencia del método ya existente (“Test de aliento *H. Pylori* - Exploraciones Digestivas Funcionales”). Sin embargo, estos resultados son preliminares, ya que es necesario optimizar y validar la metodología para ser probada con un mayor número de voluntarios.
3. En las muestras de aliento de los voluntarios se identificaron 43 compuestos orgánicos volátiles y el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los datos obtenidos permitió identificar los compuestos que contribuyen a la discriminación entre los grupos de personas sanas y personas con antecedentes de *H. pylori* que son: acetona, sulfuro de metilo de alilo, dimetilsulfuro, butano e isobutano, con una predictibilidad y bondad de ajuste de  $Q^2= 0.6331$  y  $R^2= 0.7989$ , respectivamente.

## 9. Bibliografía

- Alonso, M., et al., (2013). Analytical challenges in breath analysis and its application to exposure monitoring. *Trends in Analytical Chemistry*, 44, 78–89.
- Amann, A., et al., (2007). Breath Analysis: The Approach Towards Clinical Applications. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 7(2), 115–129.
- André, L., et al., (2020). Porous materials applied to biomarker sensing in exhaled breath for monitoring and detecting non-invasive pathologies. *Dalton Transactions*, 49(43), 15161–15170.
- Azad, K. N., et al., (2022). An Easily Digestible Review of Helicobacter pylori Diagnostics. *Clinical Microbiology Newsletter*, 44(6), 51–61.
- Bona, E. (2018). Chapter 4. Chemometrics Applied to Food Control. In *Food Control and Biosecurity* (pp. 105–133). Editorial Academic Press: London, United Kingdom.
- Bosques-padilla, F. J., et al., (2018). IV Consenso mexicano sobre Helicobacter pylori. *Revista Gastroenterología de México*. 83(3). 325-341.
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. England: Wiley & Sons, Inc.
- Buszewski, B., et al., (2009). Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 23(5), 551–556.
- Ceccarini, A., et al., (2012). Cap. 23 Breath Analysis: Analytical Methodologies and Clinical Applications. In *First Edition Analytical Techniques for Clinical Chemistry: Methods and Applications*, 651–689. Hoboken, N. J: Wiley & Sons, Inc.
- Coning, P. (2019). *A practical guide to gas analysis by gas chromatography*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, Ed.

- Cowan, J. M., et al., (2010). The Relationship of Normal Body Temperature, End-Expired Breath Temperature, and BAC / BrAC Ratio in 98 Physically Fit Human Test Subjects. *Journal of Analytical Toxicology*, 34, 238–242.
- Deng, C., et al., (2004). Determination of acetone in human breath by gas chromatography–mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Journal of Chromatography B*, 810(2), 269–275.
- Di Francesco, F., et al., (2005). Breath analysis: Trends in techniques and clinical applications. *Microchemical Journal*, 79(1–2), 405–410.
- Gallego, A. M. (2016). Análisis de metabolitos presentes en el aliento: determinación de la línea basal. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Górecki, T., et al., (1999). Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *The Analyst*, 124, 643–649.
- Gross, J. H. (2004). *Mass Spectrometry a textbook*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hyšpler, R., et al., (2000). Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 739 (1), 183–190.
- Kim, N. (2016). *Helicobacter pylori*. Singapore: Springer Nature.
- Li, Z., et al., (2017). Clinical Chemical Acta Cerebrospinal fluid metabolomic profiling in tuberculous and viral meningitis: Screening potential markers for differential diagnosis. *Clinical Chemical Acta*, 466, 38–45.
- Ligor, M., et al., (2009). Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47 (5), 550–560.

- Ligor, T., et al., (2008). The analysis of healthy volunteers' exhaled breath by the use of solid-phase microextraction and GC-MS. *Journal of Breath Research*, 2(4).
- Lukasz, K., et al., (2018). *Chemometrics in chromatography*. Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Mansour, E., et al., (2020). Measurement of temperature and relative humidity in exhaled breath. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 304, 127371.
- Martin, A. N., et al., (2010). Human breath analysis: Methods for sample collection and reduction of localized background effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (2), 739–750.
- Mc Nair, H., et al., (2009). *Basic gas chromatography*. Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons.
- Miekisch, W., et al., (2004). Diagnostic potential of breath analysis - Focus on volatile organic compounds. *Clinica Chemical Acta*, 347 (1–2), 25–39.
- Mochalski, P., et al., (2009). Suitability of different polymer bags for storage of volatile sulphur compounds relevant to breath analysis. *Journal of Chromatography B*, 877, 189–196.
- NobelPrize.org. (2005). Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2005. Press release. Nobel Prize Outreach AB 2023. Recuperado el 30 de mayo 2023, de <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2005/press-release/>
- Ochs, R. S. (2022). *Biochemistry*. Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Oderda, G. (1999). Transmission of Helicobacter pylori infection. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 13 (7), 595–597.
- Ohno, T., et al., (2003). Antimicrobial activity of essential oils against Helicobacter pylori. *Helicobacter*, 8(3), 207–215.
- Paredi, P, et al., (2003). Slower rise of exhaled breath temperature in chronic

- obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 21, 439–443.
- Paredi, P., et al., (2002). Faster Rise of Exhaled Breath Temperature in Asthma A Novel Marker of Airway Inflammation? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165 (1–4), 181-184.
- Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. USA: Wiley VCH.
- Pawliszyn, J. (2012). 2 Theory of Solid-Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*. 13-59. Jamestown Road London: Elsevier.
- Plebani, C., et al., (1999). An optimized sampling and GC-MS analysis method for benzene in exhaled breath, as a biomarker for occupational exposure. *Talanta*, 50(2), 409–412.
- Pleil, J. D., et al., (1995). Collection of a single alveolar exhaled breath for volatile organic compounds analysis. *American Journal of Industrial Medicine*, 28(1), 109–121.
- Shirey, R. E. (2012). 4 SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*. 99-113. Jamestown Road London: Elsevier.
- Smoluch, M., et al., (2019). *Mass Spectrometry*. USA: Edition Hi.
- Španěl, P., et al., (2020). Quantification of volatile metabolites in exhaled breath by selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Clinical Mass Spectrometry*, 16, 18–24.
- Sparkman, O. D., et al., (2011). *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. USA: Academic Press of Elsevier.
- Suárez Crespo, J. F., (2023). Exploraciones Digestivas Funcionales-Laboratorio de Motilidad Digestiva. Test de aliento Helicobacter Pylori. Recuperado el 30 de mayo de 2023, de <https://funcionales.es/exploraciones-y-pruebas/test-de-aliento-helicobacter-pylori/>.

- Svensson, H., et al., (2012). Exhaled breath temperature increases after exercise in asthmatics and controls. *Respiration*, 84, 283–290.
- Thompson, J. M. (2018). *Mass spectrometry*. Singapore: Pan Stanford.
- Torres, J., et al., (1998). A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico Muñoz Source. *The Journal of Infectious Diseases*, 178 (4), 1089-1094.
- Ulanowska, A., et al., (2011). Determination of volatile organic compounds in human breath for *Helicobacter pylori* detection by SPME-GC/MS. *Biomedical Chromatography*, 25(3), 391–397.
- Wang, C., et al., (2009). Breath Analysis Using Laser Spectroscopic Techniques: Breath Biomarkers, Spectral Fingerprints, and Detection Limits. *Sensors*, 9, 8230–8262.

## ANEXO I

### Teoría PLS-DA

Para poder utilizar un método de regresión (PLS) para tratar problemas de clasificación, es necesario encontrar una codificación adecuada para construir una matriz de respuesta  $Y$  que tenga en cuenta la pertenencia a la clase. Esto generalmente se logra introduciendo una matriz binaria ficticia que tiene tantas filas como el número de muestras y tantas columnas como el número de categorías a modelar. Para cada muestra, la fila correspondiente de la matriz  $Y$  ficticia contiene todos ceros excepto la columna que corresponde a la clase a la que pertenece. Por ejemplo, en un problema de cinco categorías, para todas las muestras pertenecientes a la primera clase, las filas correspondientes de la matriz  $Y$  ficticia serán

$$y_{clase1} = [1\ 0\ 0\ 0\ 0], \quad \text{ec. (9)}$$

Mientras que todas las muestras de la segunda categoría se codificaran como

$$y_{clase2} = [0\ 1\ 0\ 0\ 0] \quad \text{ec. (10)}$$

Etcétera:

$$y_{clase3} = [0\ 0\ 1\ 0\ 0] \quad \text{ec. (11)}$$

$$y_{clase4} = [0\ 0\ 0\ 1\ 0] \quad \text{ec. (12)}$$

$$y_{clase5} = [0\ 0\ 0\ 0\ 1] \quad \text{ec. (13)}$$

Una vez que la matriz ficticia se define de esta manera, la clasificación se logra mediante la construcción de un modelo de regresión que relaciona  $Y$  con la matriz descriptora  $X$

$$Y = F(X) + E_Y = \hat{Y} + E_Y \quad \text{ec. (14)}$$

(donde  $F(X)$  indica una relación funcional genérica y  $E_Y$  son los residuos de  $Y$  y  $\hat{Y}$  los valores predichos de las respuestas.

Aquí cabe destacar que, hasta el momento, todas estas consideraciones se aplican a todos los métodos de clasificación basados en regresión y no solo a PLS-DA. En este contexto, la peculiaridad de PLS-DA es que el modelo de regresión de la Ecuación 14 se calcula mediante regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R). PLS-R pertenece a la familia de modelos de regresión lineal, de modo que, en la Ecuación 14, se supone que las respuestas pronosticadas son combinaciones lineales de las variables medidas:

$$\hat{Y} = F(X) = BX \quad \text{ec. (15)}$$

siendo  $B$  la matriz que recoge los coeficientes de ponderación (coeficientes de regresión).

Dentro de la familia de modelos de regresión lineal descritos por la Ecuación 15, lo que caracteriza a PLS-R es que los coeficientes de regresión se estiman de forma sesgada, es decir, no utilizando toda la información disponible en  $X$ . En efecto, el algoritmo PLS implica proyectar los datos en  $X$  en un subespacio relevante de variables latentes ortogonales correspondientes a las direcciones donde hay máxima covarianza con las respuestas:

$$T = XR \quad \text{ec.(16)}$$

donde  $R$  es la matriz ponderada que contiene los coeficientes de la proyección, mientras que las coordenadas de las muestras en los nuevos ejes (puntuaciones) se recopilan en la matriz  $T$ . Estas puntuaciones se utilizan luego como variables independientes en la ecuación de regresión para predecir  $Y$ :

$$\hat{Y} = TQ^T \quad \text{ec. (17)}$$

siendo  $Q$  las cargas de  $Y$ , es decir, los coeficientes que relacionan las puntuaciones  $X$  con la(s) respuesta(s). Al combinar las ecuaciones 15 a 17, es evidente que

$$B = RQ^T \quad \text{ec. (18)}$$

Como se anticipó, PLS-DA opera calculando un modelo de regresión entre las variables medidas y la matriz de respuesta ficticia usando el algoritmo PLS, como



se describe en las Ecuaciones 15 a 18. Esto significa que el vector de descriptores recolectados en una muestra particular  $x_i$  se utiliza para predecir los valores de las respuestas correspondientes  $\hat{y}_i$ , lo que constituye la base para su clasificación. Sin embargo, mientras que los valores objetivo ("verdaderos") de la  $Y$  ficticia están codificados en binario, las predicciones correspondientes (que resultan de la aplicación de una herramienta de regresión cuantitativa) tienen valores reales. Por ejemplo, en el caso del problema de las cinco clases ejemplificado en las ecuaciones 9 a 13, las respuestas pronosticadas para un individuo en particular podrían ser

$$\hat{y}_i = [0.02 \quad -0.13 \quad 0.87 \quad 0.06 \quad -0.03] \quad \text{ec.(19)}$$

Entonces es necesario definir una regla que permita predecir la clase de las muestras bajo investigación, en base a los valores predichos del vector de respuesta. En este sentido, la regla más sencilla, que de todos modos se utiliza con bastante frecuencia y ha demostrado ser exitosa en muchas ocasiones, es asignar la muestra a la categoría correspondiente al mayor valor de  $\hat{y}_i$ : en base a este criterio, en el caso de la Ecuación 19, la muestra se habría asignado a la tercera clase, ya que el valor máximo de la respuesta predicha  $\hat{y}_i$  (0.87) corresponde a la tercera entrada del vector.

Cuando solo hay dos categorías involucradas, debido a la simetría del problema de clasificación, se acostumbra a usar solo un valor escalar ( $y = 1$  para clase1 y  $y = 0$  para clase2) en lugar de un vector ( $y = [1 \ 0]$  y  $y = [0 \ 1]$  para clase1 y clase2, respectivamente) para la codificación. En tal caso, la simple regla de clasificación descrita anteriormente se convierte en: asignar una muestra a la clase 1 si  $\hat{y} > 0.5$ , de lo contrario se predice que pertenecerá a la clase 2. Esta situación se ilustra gráficamente en la Figura 34.

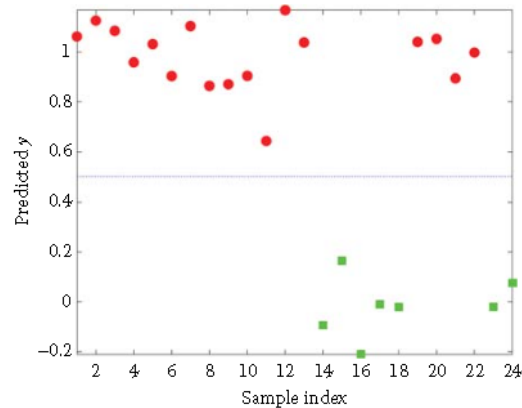


Figura 34. Gráfico de “scores” de PLS-DA para dos categorías.

La Figura 34 ilustra cómo se puede llevar a cabo la clasificación PLS-DA en el caso de un problema que involucra dos categorías en función de los valores de la respuesta predicha.

Dado que la clase 1 (círculos rojos) se codifica como  $y = 1$  y la clase 2 se codifica como  $y = 0$ , el límite de clasificación se establece en  $\hat{y} = 0.5$  (línea discontinua azul): si una muestra cae por encima de la línea horizontal ( $\hat{y} > 0.5$ ), se predice como perteneciente a la clase 1, de lo contrario ( $\hat{y} < 0.5$ ) se asigna a la clase 2. Se deben evitar los falsos negativos, entonces si el límite teórico de 0.5 resulta inadecuado, se debe calcular un límite empírico más adecuado (Lukasz, et. al., 2018).

$Q^2$  es una estimación de la capacidad predictiva del modelo y se calcula mediante validación cruzada (VC). En cada VC, los datos pronosticados se comparan con los datos originales y se calcula la suma de los errores al cuadrado. Luego, el error de predicción se suma en todas las muestras (Suma de cuadrados residual prevista o PRESS, por sus siglas en inglés). Por conveniencia, el PRESS se divide por la suma inicial de cuadrados y se resta de 1 para parecerse a la escala del  $R^2$ . Las buenas predicciones tendrán PRESS bajo o  $Q^2$  alto. Es posible tener  **$Q^2$  negativo**, lo que significa que su modelo no es nada predictivo o está sobre ajustado ( Szymańska, et al ).

## ANEXO II

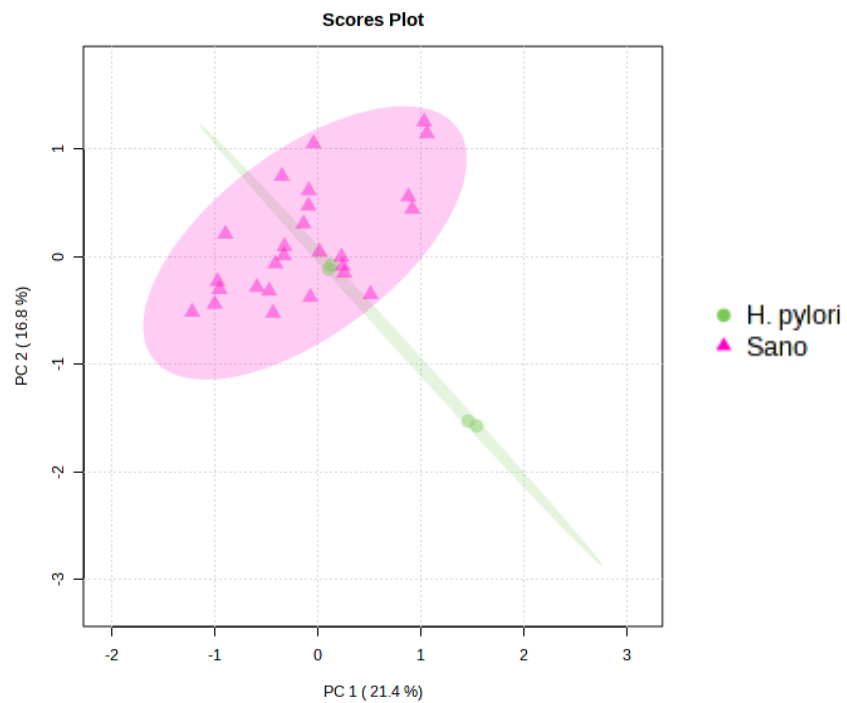


Figura 35. Gráfica de “scores” (PCA) correspondiente a las 30 muestras de aliento de todos los voluntarios.

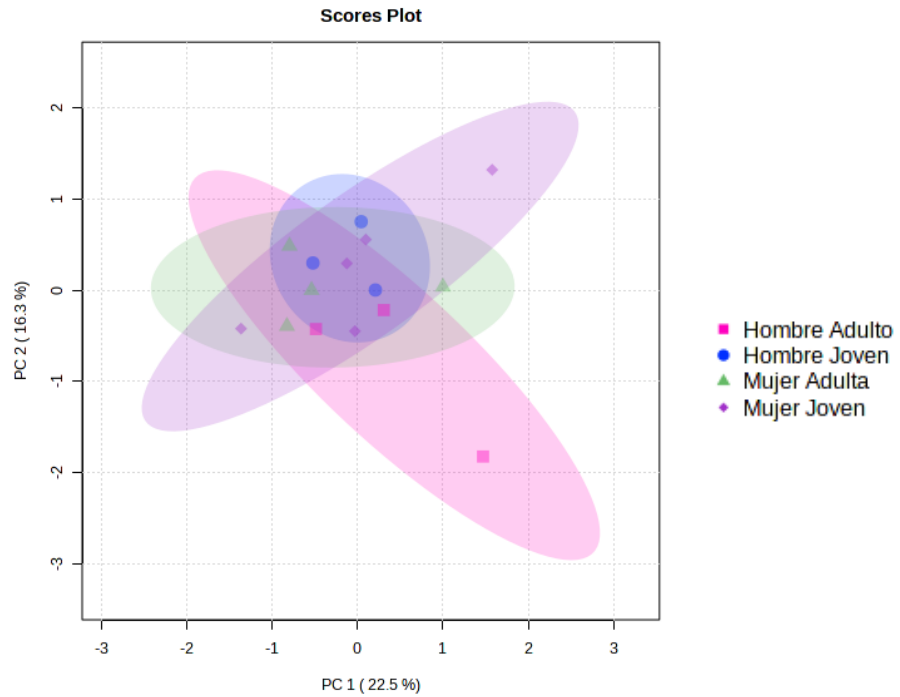


Figura 36. Gráfica de “scores” (PCA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios.

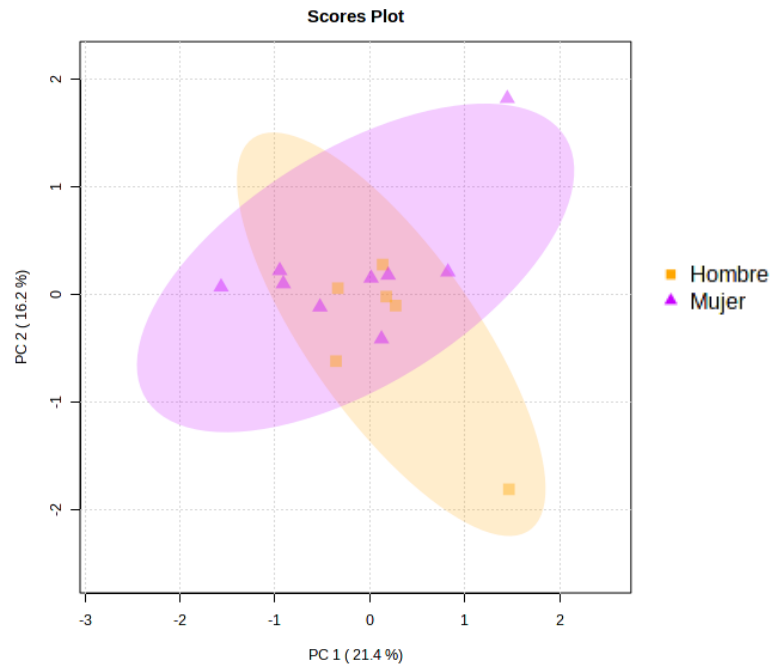


Figura 37. Gráfica de "scores" (PCA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios.

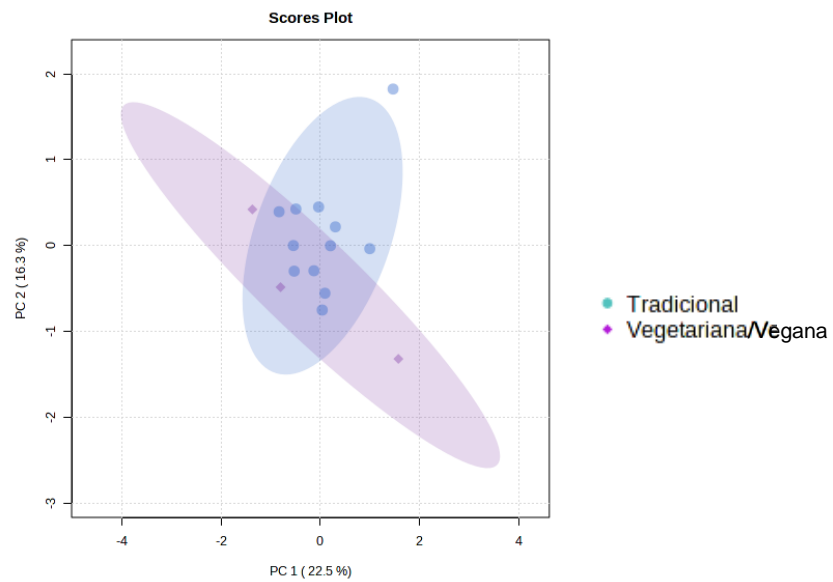


Figura 38. Gráfica de "scores" (PCA) correspondiente a las 15 muestras de aliento de la tarde de todos los voluntarios.