



Original

Estudio de compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado en una población clínicamente sana: efecto del tabaquismo

José Javier Jareño-Esteban^{a,*}, M. Ángeles Muñoz-Lucas^b, Belén Carrillo-Aranda^c, José Ángel Maldonado-Sanz^d, Ignacio de Granda-Orive^e, Antonio Aguilar-Ros^f, Concepción Civera-Tejuca^g, Carlos Gutiérrez-Ortega^b y Luis Miguel Callol-Sánchez^h, en representación del Grupo de Estudio[◇]

^a Servicio de Neumología, Hospital Central de la Defensa-Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, España

^b Unidad de Apoyo a la Investigación, Hospital Central de la Defensa, Madrid, España

^c Departamento Quirúrgico, Hospital Central de la Defensa, Madrid, España

^d Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Central de la Defensa-Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^e Servicio de Neumología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

^f Departamento de CC Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Madrid, España

^g Departamento de Química Física II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^h Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de enero de 2013

Aceptado el 9 de abril de 2013

On-line el 19 de junio de 2013

Palabras clave:

Compuestos orgánicos volátiles

Tabaquismo

Estrés oxidativo

R E S U M E N

Introducción: El humo del tabaco es una fuente de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, principales causantes de estrés oxidativo. El análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en aire exhalado es un método indirecto de medir el nivel de estrés oxidativo que se produce en las vías aéreas. El objetivo de este trabajo es conocer la influencia del tabaco en la producción de VOC en una población clínicamente sana.

Métodos: Se analizó el aire exhalado de 89 voluntarios sanos, clasificados en 3 grupos: no fumadores, exfumadores y fumadores activos. La muestra de aire exhalado se recogió mediante Bio-VOC®, y se trasapó a tubos de desorción. La técnica analítica utilizada fue: desorción térmica, cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los VOC analizados fueron hexanal, heptanal, octanal, nonanal, ácido propanoico y ácido nonanoico, cuya identificación se realizó mediante su tiempo de retención y espectro de masas referenciado en la biblioteca NIST 08, confirmándolo mediante el uso de estándares cromatográficos.

Resultados: La mayoría de los VOC analizados se encuentran a concentraciones muy bajas. Únicamente el nonanal muestra diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio, depende exclusivamente del hábito de fumar, y es independiente de la cantidad de tabaco consumido, edad y género. **Conclusiones:** El hallazgo de nonanal se asocia al consumo de tabaco, actual o previo. Al ser un producto secundario de la destrucción de la membrana celular, su hallazgo probablemente muestra daño celular en personas fumadoras y permanece una vez cesado el hábito.

© 2013 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath in a Healthy Population: Effect of Tobacco Smoking

A B S T R A C T

Introduction: Tobacco smoke is a source of free radicals and reactive oxygen and nitrogen species, which are the main causes of oxidative stress. The analysis of volatile organic compounds (VOC) in exhaled breath is an indirect method of measuring the level of oxidative stress that occurs in the airways caused by tobacco consumption. The aim of this study was to determine whether smoking influences the production of VOC, in a clinically healthy population.

Keywords:

Volatile organic compounds

Tobacco smoking

Oxidative stress

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: jjarenoesteban@yahoo.es (J.J. Jareño-Esteban), mmunozlucas@yahoo.es (M.Á. Muñoz-Lucas), carrillob195@gmail.com (B. Carrillo-Aranda), joseamaldo@gmail.com (J.Á. Maldonado-Sanz), igo01m@gmail.com (I. de Granda-Orive), agueros1@gmail.com (A. Aguilar-Ros), mccivera@farm.ucm.es (C. Civera-Tejuca), cgutort@oc.mde.es (C. Gutiérrez-Ortega), lcallol@hotmail.com (L.M. Callol-Sánchez).

◇ Los miembros del Grupo de Estudio están incluidos en el apartado titulado «Anexo».

Methods: Exhaled breath from 89 healthy volunteers, divided into three groups (non-smokers, ex-smokers and smokers) was analysed. Samples were collected using Bio-VOC® devices and transferred to universal desorption tubes. Chemical compounds were analysed by thermal desorption, gas chromatography and mass spectrometry. We analysed hexanal, heptanal, octanal, nonanal, nonanoic acid and propanoic acid, all identified by retention time and mass spectra referenced in the NIST 08 mass spectral library; confirmation was carried out using reference standards of the pure chemical compound.

Results: These VOC were found in very low concentrations. Only nonanal showed significant quantitative and qualitative statistical differences among the study groups. Nonanal concentration is dependent on smoking, but is independent of the amount of tobacco consumed, age and gender.

Conclusions: Nonanal in exhaled breath is associated with tobacco consumption, current or previous. Nonanal is a sub-product of the destruction of the cell membrane, and its finding may be indicative of cell damage in smokers. This result appears in many farmers who smoke.

© 2013 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El hábito de fumar tabaco es un factor de riesgo para neoplasias como el cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades cardiovasculares, entre otras¹.

En la mayor parte de estas enfermedades se produce un elevado grado de estrés oxidativo provocado, en su mayoría, por la cantidad de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que se originan en el humo del tabaco. El estrés oxidativo provoca daños irreversibles estructurales y funcionales de las células, tales como alteraciones en proteínas esenciales, peroxidación lipídica, rotura de cadenas y modificación de las bases nitrogenadas del ADN, un aumento intracelular elevado de Ca²⁺ libre y, en ciertos casos, apoptosis o necrosis^{2,3}.

De todas las alteraciones provocadas por el incremento del estrés oxidativo, la peroxidación lipídica genera gran cantidad de metabolitos mediante reacciones de oxidación catalizadas por sistemas enzimáticos asociados al citocromo P450^{4,5}, como son alcanos, alquenos, aldehídos y ácidos carboxílicos entre otros, todos ellos de bajo peso molecular, volátiles y conocidos como compuestos orgánicos volátiles (VOC), y que pueden ser excretados por las vías aéreas. La presencia de estos en el aire exhalado sugiere la existencia de estrés oxidativo en la vía aérea y en los pulmones. Por ejemplo: los aldehídos lineales como hexanal, heptanal y nonanal son metabolitos finales de procesos de peroxidación lipídica de los ácidos grasos ω 3 y ω 6, componentes principales de los fosfolípidos que forman parte de las membranas celulares⁶.

El objetivo de este trabajo es conocer si el tabaquismo influye en la producción de VOC en aire exhalado como resultante del estrés oxidativo, en una población clínicamente sana. No serán estudiados el resto de los compuestos que se producen en las reacciones oxidativas de las macromoléculas biológicas.

Pacientes y método

Diseño del estudio y definición de los grupos

Estudio casos control, con muestreo consecutivo no probabilístico. Se seleccionaron un total de 89 personas, todos ellos voluntarios entre trabajadores de los centros participantes formados por administrativos, personal sanitario, médicos, profesores universitarios, militares y familiares. Las posibles contaminaciones de su lugar de residencia no se tuvieron en cuenta por no ser objeto de estudio y ser una variable muy compleja de registrar. Se establecieron 3 grupos en función del consumo de tabaco: 35 no fumadores, 24 exfumadores y 30 fumadores activos. No se consideró como grupo aparte y motivo de estudio la cualidad de fumador pasivo.

Los *criterios de inclusión* para los 3 grupos exigieron la aceptación personal para participar en el estudio, edad mayor de 40 años, ser no fumadores, ex fumadores, o fumadores de más

de 20 paquetes por año. Los participantes no estaban sometidos a especiales condiciones ambientales en su trabajo. A todos ellos se les realizó exploración clínica y complementaria, incluyendo electrocardiograma, radiografía de tórax, hemograma, bioquímica y curva flujo/volumen. Ningún participante presentó signos o síntomas de enfermedad. Se consideraron *criterios de exclusión* la existencia de enfermedad pulmonar, cardiaca, endocrina y tumoral actual o previa de cualquier sistema, o la negativa a participar en el estudio. No se aplicó restricción por razón de género.

El protocolo de estudio fue autorizado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Central de la Defensa «Gómez Ulla» (N.º R: IS-404030-S-06-000153).

Compuestos estudiados

Los compuestos estudiados fueron aldehídos lineales en orden al número de carbonos existentes en la molécula y que han sido descritos en la bibliografía consultada (hexanal, heptanal, octanal, nonanal), así como ácidos carboxílicos (ácido propanoico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico y ácido nonanoico), siguiendo la secuencia de igualdad en el número de átomos de carbono que los aldehídos. Los ácidos hexanoico, heptanoico y octanoico no se detectaron, por lo que fueron eliminados del estudio.

Toma de la muestra

Tras una hora en reposo, sin fumar y en ayuno, se recogió aire exhalado correspondiente al final de la capacidad vital forzada, lo más representativo posible del aire alveolar. Se utilizaron cámaras Bio-VOC® Breath Sampler (Markes Int.)TM y se repitió la maniobra 3 veces para la preconcentración de los compuestos. Simultáneamente se recogió una muestra de aire ambiental de la sala en donde permaneció la persona estudiada, lo que permitió comparar los niveles de VOC del aire ambiente y del exhalado, con el fin de minimizar las posibles variaciones ambientales.

Tras cada maniobra, el aire recogido se traspasó a un tubo de desorción recubierto internamente de 3 materiales adsorbentes: Tenax TA + Graphitised Carbon Black + Carbonised Molecular Sieve (Markes Int.TM). El tubo quedó sellado con Difflocks Caps (Markes Int.TM) para su posterior análisis. Todas las muestras se analizaron en un plazo inferior a 24 h desde su recogida.

Método analítico cromatográfico

La técnica analítica utilizada fue la desorción térmica-cromatografía de gases y espectrometría de masas. El método analítico que se describe a continuación fue desarrollado por nuestro grupo.

Los tubos con la muestra se sometieron a un proceso de desorción a 250 °C en un sistema de desorción térmica Ultra TDTM multi-tube autosampler y UnityTM Thermal desorber con una trampa

fría (Unity General purpose Hydrophobic. U-T2GPH [Markes Int. Ltd.]). Posteriormente, los compuestos fueron separados por cromatografía de gases en un sistema 7890A, utilizando una columna cromatográfica DB1-30 m × 0,25 mm × 1 μm, con helio como gas portador, identificándose por espectrometría de masas con 5975 C VL MSD (Agilent Tech.). El modo de adquisición de datos fue en SCAN y el intervalo de masas para la detección se fijó entre 40 y 300 m/z (relación masa/carga).

La cromatografía programada se inició a una temperatura de 40 °C y permaneció constante durante 10 min. A continuación fue aumentando en 20 °C/min hasta llegar a 250 °C, permaneciendo así durante otros 10 min. Como última etapa, se alcanzaron los 300 °C a una velocidad de 30 °C/min.

Los compuestos se identificaron mediante su tiempo de retención y espectro de masas referenciado a las librerías de espectros NIST 08, por medio de patrones cromatográficos (Fluka®).

Se consideró el «límite de detección» (LOD) de un compuesto cuando aquel se pudo identificar mediante su espectro de masas, tiempo de retención y con una abundancia relativa mayor o igual a 3 veces la relación señal/ruido, mientras que para el «límite de cuantificación» (LOQ) se exigió 10 veces la relación señal/ruido. De acuerdo con estos «límites» -LOD y LOQ-, definimos:

1. compuestos *no detectados*, aquellos cuyo valor se encuentra por debajo de su LOD
2. compuestos *no cuantificados*, aquellos que son detectados pero no es posible su cuantificación, es decir, cuyos valores se encuentran entre su LOD y su LOQ
3. compuestos *cuantificados*, los que presentan valores por encima de LOQ

Los datos cuantitativos se obtuvieron mediante la integración del área del ión cuantificador del espectro de masas para cada uno de los VOC, medido en cuentas por segundo. Dada la posible variabilidad que pudiera existir en el proceso de desorción, los datos se normalizaron en función del área del ión 207 (correspondiente al hexametilciclotrisiloxano), utilizado como compuesto de referencia interno, procedente de los tubos de desorción.

Todos los valores cuantitativos se calcularon mediante la fórmula: $(A_{bc} \text{ VOC}) / (A_{bc} \text{ Siloxano}) \times 100$

Donde A_{bc} : área bajo la curva de cada compuesto

Se asumió como compuesto endógeno cuando mostraba relación de valor en aire exhalado/ambiental mayor a 1.

El método analítico ha sido validado según los criterios descritos en la ICH Q2. *Validation of Analytical Procedures-2005*⁷.

Método estadístico

Como índices descriptivos se emplearon la media, con su desviación estándar, o la mediana, con su rango intercuartílico, y las frecuencias absolutas y relativas (%). Para determinar asociaciones entre variables se aplicaron los test de Kruskal Wallis –para valorar la asociación de los diferentes VOC en función del tabaquismo–; el de Mann Whitney –para valorar la asociación entre las personas no fumadoras frente a fumadoras o ex fumadoras y los VOC–, y el test de correlación lineal de Spearman –para valoración de la concentración de nonanal y edad–.

En todos los casos, como grado de significación estadística se consideró un valor de $p < 0,05$ y la aplicación estadística utilizada fue SPSS® versión 15.

Resultados

En la **tabla 1** aparecen recogidas las características de la población de estudio. Nuestra muestra consta de 89 personas, todas ellas

Tabla 1
Características de los sujetos de estudio

	N = 89
Edad (media en años), media (DE)	49,3 (9,5)
Género (hombres/mujeres)	(42/47)
Fumadores/ex fumadores/no fumadores	30/24/35
Tabaquismo (paq/año), media (DE)	
Fumadores	30,9 (18,6)
Ex fumadores	26,5 (21,6)

Tabla 2
Distribución de frecuencias

	Categorías		
	No detectado	No cuantificado	Cuantificado
Hexanal	64 (72%)	10 (11%)	15 (17%)
Heptanal	56 (63%)	5 (6%)	28 (31%)
Octanal	72 (81%)	4 (4%)	13 (15%)
Nonanal	49 (55%)	9 (10%)	31 (35%)
Ácido propanoico	41 (46%)	5 (6%)	43 (48%)
Ácido nonanoico	74 (83%)	1 (1%)	14 (16%)

voluntarias sanas, con una edad media de 49,3 (9,5) años. En cuanto a la distribución por género, un 47% eran hombres y un 53% mujeres. Del total, un 39% eran no fumadores, un 34% fumadores y un 27% exfumadores, con un consumo de tabaco de 30,9 (18,6) paquetes por año para los fumadores, y 26,5 (21,6) paquetes por año para los exfumadores.

Se obtuvieron 3 categorías según los valores obtenidos fueran a) *cuantificados*, b) *no cuantificados*, y c) *no detectados*, según criterios definidos en el apartado *Pacientes y método*. La distribución de las frecuencias queda recogida en la **tabla 2**. Los valores normalizados de las concentraciones de los VOC vulneran una distribución normal.

En la **tabla 3** quedan recogidos los valores de mediana (IQR) para cada uno de los VOC estudiados referidos a cada grupo. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas para el nonanal entre los 3 grupos: no fumadores 0,160 (0,160–0,215), ex fumadores 0,160 (0,160–5,650) y fumadores 2,050 (0,160–10,25) ($p = 0,04$). Los valores de p , basados en el test de Mann Whitney, comparando los grupos 2 a 2, quedan reflejados en la **figura 1**.

La dispersión de datos en exfumadores y en fumadores es muy elevada, de modo que los valores de los primeros quedan incluidos en los resultados de los segundos. De aquí se parte para unificar un único grupo de tabaquismo (fumadores y exfumadores), y enfrentarlo con el grupo de no fumadores. El estudio de la comparación de los datos obtenidos entre estos 2 grupos vuelve a mostrar significación estadística para el nonanal entre ambos (test de Mann Whitney ($p = 0,019$)). El resto de los VOC no muestran diferencias entre los grupos citados.

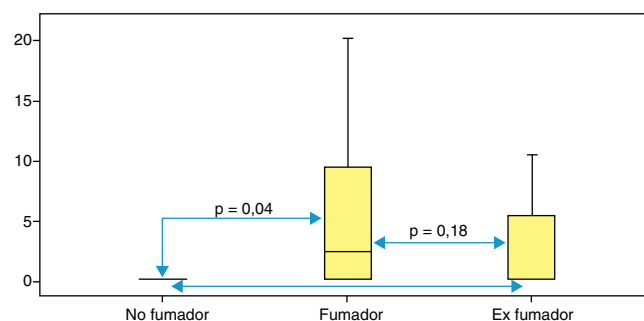


Figura 1. Representación de la mediana e IQR de nonanal referido a los 3 grupos de estudio. Valores de p basados en el test de Mann Whitney.

Tabla 3
Mediana y rango intercuartílico de cada VOC en cada grupo y valor de p

	Mediana y rango intercuartílico			p [*]
	No fumadores = 35	Ex fumadores = 24	Fumadores = 30	
Hexanal	0,095 (0,095-0,200)	0,095 (0,095-0,200)	0,095 (0,095-6,19)	0,181
Heptanal	0,055 (0,055-0,930)	0,055 (0,055-1,300)	0,055 (0,055-1,960)	0,701
Octanal	0,075 (0,075-0,750)	0,075 (0,075-0,750)	0,075 (0,075-0,750)	0,604
Nonanal	0,160 (0,160-0,215)	0,160 (0,160-5,650)	2,050 (0,160-10,25)	0,041
Ácido propanoico	0,175 (0,105-2,090)	0,105 (0,105-1,840)	2,200 (0,105-6,27)	0,153
Ácido nonanoico	0,135 (0,135-0,260)	0,135 (0,135-0,135)	0,135 (0,135-0,135)	0,560

* Test de Kruskal Wallis.

Se realizó un análisis cualitativo de *detección/no detección* de VOC en función de nuestros límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), previamente establecidos y definidos en el apartado *Pacientes y método*. La distribución de frecuencias en porcentaje y los valores de «p» calculados con χ^2 quedan recogidos en la [tabla 4](#). De nuevo el nonanal fue el único compuesto que presentó diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos (*no fumadores 20%, fumadores 53% y exfumadores 29%*), con una $p = 0,016$.

Dado que, en nuestra muestra, el nonanal está relacionado con el consumo de tabaco, decidimos estudiar la relación entre la cantidad de tabaco fumado (expresado en paquetes por año) y la cantidad de nonanal exhalado. Tras aplicar el test de la correlación lineal de Spearman, no observamos correlación entre la cantidad de tabaco consumida y la cantidad exhalada de nonanal ($p = 0,823$). Tampoco se encontró correlación entre el nonanal con la edad y el género (hombres: $r = 0,05$; $p = 0,753$ y en mujeres: $r = 0,081$; $p = 0,588$).

Discusión

Este trabajo evalúa las diferencias existentes en la concentración de los VOC del aire exhalado en función del consumo de tabaco en nuestra población de estudio, formada exclusivamente por voluntarios sanos.

Según los resultados obtenidos por nosotros, el único compuesto relacionado con el tabaco es el nonanal. Su origen biológico es conocido y este resultado se apoya en que el tabaco provoca estrés oxidativo, lo que genera la destrucción de las células y aparecen los VOC, cuestión importante para su aplicación como marcadores de aquel. El hallazgo de nonanal es independiente de la edad, género y cantidad de tabaco consumido, pero sí está relacionado con la cualidad de «*ser o haber sido fumador*» o «*no ser nunca fumador*». Como dato importante, no se objetivó correlación cuantitativa entre tabaco consumido y nonanal exhalado. Estos hallazgos no se han encontrado en la bibliografía consultada. Es decir, la aparición de nonanal se ve influida por la cualidad de *fumador, pero es independiente de la cantidad de tabaco consumido*. Obliga a pensar en la persistencia de la lesión celular producida por el consumo de tabaco, que mantiene un estrés oxidativo elevado, aun cuando se

Tabla 4
Comparación del porcentaje según tabaquismo en el que se detectan los marcadores en los diferentes grupos

	No fumadores (%)	Ex fumadores (%)	Fumadores (%)	p [*]
Hexanal	11,4	8,3	30,0	0,059
Heptanal	25,7	37,5	33,3	0,609
Octanal	8,6	20,8	16,7	0,393
Nonanal	20,0	29,2	53,3	0,016
Ácido propanoico	51,4	50,0	60,0	0,711
Ácido nonanoico	20,0	12,5	13,3	0,670

* χ^2 de Pearson.

haya abandonado el hábito de fumar mucho tiempo antes. El mantenimiento de esta alteración celular podría evolucionar a patología inflamatoria o tumoral, dependiendo del polimorfismo del citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A1)⁸, lo que debe ser motivo de estudios posteriores.

Revisando la bibliografía, la mayor parte de los estudios relacionados con VOC en aire exhalado están orientados hacia la búsqueda de marcadores que permitan diferenciar poblaciones con cáncer de pulmón frente a otras no tumorales. En aquellos trabajos, se dividen los grupos de estudio en función del tabaquismo agrupando, por un lado, fumadores activos y, por otro, exfumadores y no fumadores, o sin hacer referencia clara a su cualidad de fumador o exfumador. Aunque ha sido estudiada la determinación de VOC en fumadores, exfumadores y no fumadores del grupo control de muchos de estos trabajos, los resultados siempre vienen referidos a los hallazgos respecto a cáncer de pulmón y enfermedad pulmonar obstructiva crónica⁹⁻¹¹, pero son muy escasas las publicaciones que comparen fumadores y no fumadores dentro de un grupo sano exclusivamente en aire exhalado¹², y que permitan valorar la importancia a la exposición del humo del tabaco como responsable del incremento del estrés oxidativo. Chambers et al. abren una vía con la detección de VOC en sangre, pero ciñéndose al estudio de hidrocarburos aromáticos presentes en el humo del tabaco¹³.

Existe una gran diversidad de compuestos descritos en la literatura, que van desde alcanos, hidrocarburos aromáticos, otros hidrocarburos, alcoholes, compuestos carbonílicos y ácidos carboxílicos, y otras muchas familias de compuestos. Estudios como los de Phillips et al.^{9,14,15}, y Poli et al.¹⁰, que mostraban una elevadísima sensibilidad y especificidad utilizando combinaciones de diferentes hidrocarburos, fueron posteriormente criticados *al no poder explicar cuál era el origen metabólico de los compuestos propuestos*. Al respecto es interesante la publicación de Horváth et al.¹⁶ desarrollando un análisis crítico de los resultados de los autores citados.

Actualmente existe una tendencia hacia el estudio de compuestos oxigenados como resultado de procesos de peroxidación de los componentes celulares. Diversos autores, en últimos trabajos, ya incluyen a los aldehídos y cetonas, entre otros, como posibles marcadores de estrés oxidativo¹⁷⁻²². Nuestro estudio se ha centrado en aldehídos y en ácidos carboxílicos (tal como se describe en el apartado *Pacientes y método*), por la elevada frecuencia de aparición de estos 2 grupos de compuestos en múltiples determinaciones llevadas a cabo previamente²³. Estos compuestos, cuyo origen sí es conocido, son metabolitos intermedios y finales de procesos de peroxidación lipídica de los ácidos grasos que forman parte de las membranas celulares. Por ejemplo, hexanal, heptanal y nonanal proceden de la oxidación de los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ (ácidos grasos poliinsaturados [PUFA]) componentes principales de los fosfolípidos⁶. En cuanto al ácido propanoico, es un antiinflamatorio natural, y el ácido nonanoico es un resultante de la oxidación completa del aldehído en un entorno muy oxidante.

Hay que tener en cuenta que los VOC no solo tienen un origen sistémico sino también pueden ser exógenos, procedentes del aire ambiental o del humo del tabaco. Discriminar los compuestos

de procedencia endógena de los de procedencia exógena es fundamental para este tipo de estudios, en los cuales la recogida y tratamiento de la muestra previa al análisis cobra una gran relevancia. Se han propuesto diversas metodologías al respecto. Phillips et al.^{9,12,14,15} proponen un sencillo cálculo matemático restando a las concentraciones normalizadas de aire exhalado las ambientales. Esta aproximación ha sido cuestionada al no explicar la complejidad de la absorción pulmonar de los compuestos exógenos y la exhalación posterior tras el metabolismo de los mismos en forma de diferentes VOC^{16,24,25}. Otro método propuesto fue el mantener al sujeto respirando aire puro, libre de VOC, durante un periodo de tiempo entre 4 y 30 min²⁶. Aun considerándose un buen método, no ha sido seguido en la mayor parte de los trabajos.

Diversos autores, incluidos nosotros, procedimos a la recogida de las muestras a través de un Bio-VOC[®], tal como se refiere en el apartado *Pacientes y método*, que permite el paso a su través del aire proveniente del espacio muerto anatómico, a fin de obviar en lo posible la contaminación de la muestra por aire no alveolar. Para distinguir compuestos exógenos de endógenos, se recogió de forma paralela una muestra de aire ambiental, y se compararon ambos tipos de muestras. En lugar del método de aproximación descrito anteriormente por Phillips et al.^{9,12,14,15}, nosotros procedimos a normalizar las concentraciones con respecto al patrón interno, utilizado como factor de corrección de la variabilidad del proceso de desorción de los tubos. Se asumió como compuesto endógeno aquel cuya relación exhalado/ambiental fue mayor a 1, ya que nos daba la *seguridad* de tratarse de un compuesto de origen endógeno. No obstante somos conscientes de que con este método aumentamos la especificidad pero disminuimos la sensibilidad.

En *conclusión*, la valoración cuantitativa o cualitativa de nonal en aire exhalado está ligada al consumo del tabaco. El resto de los compuestos estudiados no muestran correlación con el hábito. Existe una falta de estandarización en cuanto a la metodología de la recogida de la muestra.

Financiación

Este estudio fue financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI07/1116), Neumomadrid 2008 y SEPAR 2010 (registro nº: 881). Los autores declaran que no existe conflicto de intereses potenciales con cualquiera de las empresas cuyos productos o servicios pueden ser discutidos en este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Anexo

Miembros del Grupo de Estudio: José Luis Álvarez-Sala Walther -Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid; Rodolfo Álvarez-Sala Walther -Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid; Eva Arias Arias -Hospital 12 de Octubre; Manuel Caamaño Somoza -Universidad Complutense de Madrid; María Vicenta García Rosado -Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla; Francisco Roig Vázquez -Hospital Infanta Elena, Madrid; Francisco Villegas-Fernández -Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla -Universidad de Alcalá de Henares; Gema Rodríguez Trigo -Hospital Clínico San Carlos, Madrid; José Luis López Colón -Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid.

Bibliografía

1. Carrión Valero F, Hernández JR. El tabaquismo pasivo en adultos. Arch Bronconeumol. 2001;38:137-46.
2. Kodama M, Kaneko M, Aida M, Inoua F, Nakajamat T. Free radical chemistry of cigarette smoke and its implications in human cancer. Anticancer Res. 1997;17(1A):433-7.
3. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Cir Res. 2000;87:840-4.
4. Van Klaveren RJ, Nemery B. Role of reactive oxygen species in occupational and environmental obstructive pulmonary disease. Curr Opin Pulm Med. 1999;5:118-23.
5. Weisburger JH. Prevention of cancer and other chronic diseases worldwide based on sound mechanisms. Biofactors. 2000;12:73-81.
6. Kneepkens CM, Lepage G, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. Free Radic Biol Med. 1994;17:127-60.
7. ICH Q2. Validation of Analytical Procedures. 2005.
8. Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, Kloss R, et al. Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers. Clin Chim Acta. 2008;393:76-84.
9. Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, Gagliardi AJ, Gleeson K, Greenberg J, et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. Chest. 2003;123:2115-23.
10. Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. Respir Res. 2005;6:71.
11. Phillips CO, Syed Y, Parthaláin NM, Zwiggelar R, Claypole TC, Lewis KE. Machine learning methods on exhaled volatile organic compounds for distinguishing COPD patients from healthy controls. J Breath Res. 2012;6:036003. <http://dx.doi.org/10.1088/1752-7155/6/3/036003>.
12. Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999;729:75-88.
13. Chambers DM, Ocariz JM, McGuiRK MF, Blount BC. Impact of cigarette smoking on volatile organic compound (VOC) blood levels in the U.S. population: NHANES 2003-2004. Environ Int. 2011;37:1321-8.
14. Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. Lancet. 1999;353:1930-3.
15. Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, Greenberg J, et al. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. Cancer Biomark. 2007;3:95-109.
16. Horváth I, Lázár Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. Eur Respir J. 2009;34:261-75.
17. Poli D, Goldoni M, Corradi M, Acampa O, Carbognani P, Internullo E, et al. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatization SPME-GC/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010;878:2643-51.
18. Fuch P, Loesken C, Shubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. Int J Cancer. 2010;126:2663-70.
19. Svensson S, Larstad M, Broo K, Olin AC. Determination of aldehydes in human breath by on-fiber derivatization solid phase microextraction and GC-MS. J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci. 2007;860:86-91.
20. Lu CR, Hu YJ, Chen EG, Qiu YH, Ying KJ. Measurement of exhaled volatile organic compounds in lung cancer patients. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za zhi. 2010;33:104-8.
21. Ligor M, Ligor T, Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, Klieber M, et al., Miekisch W. Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. Clin Chem Lab Med. 2009;47:550-60.
22. Rudnicka J, Kowalkowski T, Ligor T, Buszewski B. Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics. J Chromatogr B Analyt Biomed Life Sci. 2011;879:3360-6.
23. Muñoz Lucas MA, Jareño Esteban J, Maldonado Sanz JA, Carrillo Aranda B, Rodríguez Trigo G, Civera Tejuca C, et al. Determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en aire exhalado en una población con cáncer de pulmón mediante la técnica desorción térmica/cromatografía de gases/espectrometría de masas (TD/GC/MS). Arch Bronconeumol. 2012;48 Supl. Esp. Congreso: 136-7.
24. Buszewski B, Kesy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. Biomed Chromatogr. 2007;21:553-66.
25. Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Mieth M, Schubert JK. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis. J Breath Res. 2008;2:1-7.
26. Miekisch W, Schubert JK. From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: technical developments in breath analysis. TrAC. 2006;7:665-73.