

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

Trabajo de fin de carrera titulado:

**“MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA EN 3
GRUPOS VULNERABLES EN LA CIUDAD DE QUITO”**

Realizado por:

LUZ CARIME CADAVID MORA

Director del proyecto:

PABLO CASTILLEJO, PhD

Como requisito para la obtención del título de:

MAESTRIA EN GESTION AMBIENTAL EN LA INDUSTRIA

Quito, julio de 2015

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, LUZ CARIME CADAVID MORA, con cédula de identidad #1719505068, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que ha consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

LUZ CARIME CADAVID MORA

C.C.: 1719405068

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA EN 3
GRUPOS VULNERABLES EN LA CIUDAD DE QUITO”**

Realizado por:

LUZ CARIME CADAVID MORA

Como Requisito para la Obtención del Título de:

MAESTRIA EN GESTION AMBIENTAL EN LA INDUSTRIA

Ha sido dirigido por el profesor

PABLO CASTILLEJO

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor

PABLO CASTILLEJO

DIRECTOR

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

Magdalena Díaz

Katty Coral

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador

Magdalena Díaz

Katty Coral

Quito, julio de 2013

DEDICATORIA

A Juan Esteban.

AGRADECIMIENTO

Al Ministerio del Interior y La Subdirección Técnica Científica del Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses Pichincha.

Al personal de Ecuadiabetes, Dr. Gerardo Armendáriz y al Laboratorio Clínico.

A mis compañeras de trabajo de la sección de Toxicología Forense del LCCF.

Índice general

TABLA DE ACRÓNIMOS.....	2
CAPÍTULO I.....	4
1 INTRODUCCIÓN.....	4
2 EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	7
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
2.2 DIAGNOSTICO DEL PROBLEMA.....	12
2.3 PRONÓSTICO	13
2.4 CONTROL DE PRONÓSTICO	13
2.5 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	13
2.6 SISTEMATIZACION DEL PROBLEMA	13
2.7 OBJETIVO GENERAL	14
2.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2.9 JUSTIFICACIONES	14
2.10 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	15
2.11 DEFINICIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO EN EL ÁREA DE ESTUDIO	16
3 MARCO TEORICO	18
3.1 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA.....	22
3.2 ADOPCIÓN DE UNA PERSPECTIVA TEÓRICA.....	23
3.3 MARCO CONCEPTUAL	24
Carboxihemoglobina:.....	24
Grupos vulnerables:.....	24
Validación:	24
Estandarización:.....	25
CAPÍTULO III	26
4 METODOLOGIA	26
4.1 Modalidad de investigación	26
4.2 Diseño Experimental.....	26
4.3 Selección de instrumentos de investigación	26
4.4 Hipótesis.....	27
5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VARIABLES	27

5.1 VARIABLE DEPENDIENTE:	27
Concentración de COHB:	27
5.2 VARIABLE INDEPENDIENTE:	27
Grupos de personas vulnerables de la ciudad de Quito	27
5.3 VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS	28
Toma de muestra:.....	28
Determinación analítica.....	28
5.4 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO:	28
Técnica:.....	28
5.4.1 Método 1:	29
Reactivos:.....	29
Preparación de reactivos:	29
Procedimiento:	29
Cálculos:.....	30
5.4.2 Método 2:	31
INSPI - Reducción con sulfihidrato amónico	31
Reactivos:.....	31
Preparación de reactivos:	31
Procedimiento:	31
Cálculos:.....	32
5.5 Diseño de la validación:	32
Límite de Detección:	32
Límite de Cuantificación:	33
Exactitud:.....	33
Veracidad:.....	33
Precisión:	33
Repetibilidad:.....	33
Reproducibilidad:.....	33
Varianza:	34
Desviación estándar:	34
Coeficiente de variación:	34
C. Coeficiente de variación:.....	35

D. Coeficiente de asimetría:	35
Prueba F:.....	36
6 ASPECTOS ADMINISTRATIVOS.....	36
6.1 RECURSOS HUMANOS	36
6.2 RECURSOS MATERIALES.....	36
6.2.1 EQUIPO.....	37
CAPÍTULO IV.....	38
7 RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
7.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO PARA DETERMINACIÓN CARBOXIHEMOGLOBINA	38
Precisión:	38
Veracidad:.....	41
Límite de Detección y de Cuantificación.....	42
7.2 Resultados Mediciones Muestras.....	43
Grupo1: Población control.....	44
Grupo 2: Población zona expuesta a emisiones de CO, Sur de Quito.....	45
Grupo 3: Población zona expuesta a emisiones de CO, Centro Histórico.....	46
Grupo 4: Población personas fumadoras.	46
CAPITULO V	48
8 CONCLUSIONES.....	48
9 RECOMENDACIONES.....	50
CAPITULO VI.....	52
10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS.....	57

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Repetibilidad y reproductibilidad, Pág. 38
TABLA 2: Coeficiente de variación nivel bajo, Pág. 39
TABLA 3: Coeficiente de variación nivel medio. Pág.40
TABLA 4: Coeficiente de variación nivel alto, Pág. 41
TABLA 5: Veracidad, Pág.42
TABLA 6: Limite, detección y cuantificación, Pág. 43

TABLA 7: Resultados medición de COHB en sangre, Pág. 43
GRAFICO 1: Localización de estaciones de monitoreo REMMAQ, Pág. 6
GRAFICO 2: Representación, técnica espectrofotométrica. Pág. 20
GRAFICO 3: Espectros de absorción de derivados de la hemoglobina. Pág.21
GRAFICO 4: Valor media de concentración de CO. Pág.44
GRAFICO 5: Mediciones de COHB en Nono. Pág. 44
GRAFICO 6: Mediciones de COHB en Sur. Pág. 45
GRAFICO 7: Mediciones de COHB en Centro. Pág. 46
GRAFICO 8: Mediciones de COHB en Fumadores. Pág. 46

“MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA EN 3 GRUPOS VULNERABLES EN LA CIUDAD DE QUITO”

Luz Carime Cadavid Mora

Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.

Resumen

Una manera de evaluar la afectación humana por un contaminante, es la determinación de un bioindicador, en este estudio se cuantificó la presencia de Carboxihemoglobina y su relación con la contaminación por Monóxido de carbono, usando una técnica espectrofotométrica, basada en la reducción con Ditionito de Sodio, metodología que fue validada para el posterior uso en las muestras de 3 poblaciones vulnerables de la ciudad de Quito; obteniendo en esta validación un Límite de Detección de 0.79% COHB; Límite de Cuantificación 1.94% COHB y la precisión obtenida tiene un CV < 10% en todos los niveles, valores aceptables para la cuantificación de carboxihemoglobina.

Palabras clave:

Carboxihemoglobina, Validación.

Abstract

One way to assess human involvement by a contaminant is the determination of a biomarker. In this study the presence of carboxyhemoglobin and its relation to Carbon monoxide pollution was measured using a spectrophotometric technique based on reduction with sodium dithionite, this methodology was validated for later use in 3 samples vulnerable with this type of contamination, in the populations in Quito; obtaining in this validation a detection limit of 0.79% COHB; limit of quantification 1.94% COHB and accuracy obtained has a CV <10% at all levels, acceptable values for the quantification of carboxyhemoglobin.

Key words:

Carboxyhemoglobin, Validation.

TABLA DE ACRÓNIMOS

1. LCCF: Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses
2. CO: Monóxido de Carbono.
3. CO₂: Dióxido de Carbono.
4. HB: Hemoglobina.
5. COHB: Carboxihemoglobina
6. ppm: Partes por millón.
7. IBE: Índice Biológico de Exposición.
8. BLV: Valores Límite Biológicos
9. OPS-OMS: Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud.
10. REMMAQ: Red Metropolitana de Monitoreo Atmosférico de Quito.
11. DMQ: Distrito Metropolitano de Quito.
12. EPA: Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental).
13. UNE-EN ISO: Una Norma Española - European Norm (Norma Europea) International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización).
14. ISO 17025:2005: Es una normativa internacional desarrollada por ISO en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración, versión del año 2005.
15. IQCA: Índice Quiteño de la Calidad del Aire.
16. CORPAIRE: Corporación Municipal de Mejoramiento de la Calidad de Aire de Quito.
17. NECA: Norma Ecuatoriana de Calidad de Aire.

18. TULAS: Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria.
19. FDA: Food and Drugs Administration.(Agencia de Alimentos y Medicamentos)
20. GLP: Good Laboratory Pratices (Buenas Practicas de Laboratorio)
21. DEA: Drug Enforcement Administration, (Administración de Cumplimiento de Leyes sobre las Drogas).
22. TIAFT: The International Association of Forensic Toxicologists (Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses).
23. INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.
24. AR: es el radio de las absorbancias A_{420}/A_{432} del hemolizado en solución diluyente de COHB.
25. $F_1 F_2 F_3$: Son constantes calculadas de las absorbancias molares de la COHB a 420 y 432nm.
26. nm: Nanómetros (El nanómetro es la unidad de longitud que equivale a una mil millonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)).
27. S: Desviación estándar.
28. S^2 : Varianza.
29. CV: Coeficiente de Variación.
30. r: Repetibilidad.
31. R: Reproducibilidad.

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

Cuando un hidrocarburo arde con suficiente oxígeno, los productos son dióxido de carbono y agua. Dado que ambas sustancias son componentes normales del aire, generalmente no se consideran como contaminantes. Pero cuando no hay suficiente oxígeno presente se forma otro óxido del carbono, el monóxido de carbono. (Hill, 1999)

El monóxido de carbono es un gas originado por combustión incompleta, por falta de apropiada mezcla con el oxígeno, de compuestos orgánicos sólidos líquidos o gaseosos (carbones, gasolinas, propano/butano, etc.); cuando para la combustión hay suficiente proporción de oxígeno (una molécula de éste por cada átomo de carbono) se origina dióxido de carbono (Repetto, 2009):



Pero cuando la proporción es menor, se produce el monóxido:



El monóxido de carbono es un constituyente natural de la atmosfera y un contaminante cuando está presente por encima de las concentraciones de fondo, La concentración atmosférica global es de 0.1ppm, debido a las emisiones de monóxido de carbono de los motores de

combustión interna, los niveles más altos de este gas tóxico tienden a ocurrir en las áreas urbanas congestionadas, en que está expuesto el mayor número de personas como en las horas pico, en ocasiones los niveles de monóxido de carbono en la atmósfera han llegado a alcanzar concentraciones de 50-100ppm, muy peligrosos para la salud humana. (Stanley, 2007)

La carboxihemoglobina es una forma alterada de la hemoglobina, una proteína presente en los glóbulos rojos que transporta el oxígeno y el dióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos corporales. La transformación de oxihemoglobina (Hb.Fe.O₂) en carboxihemoglobina (Hb.Fe.CO), son reacciones reversibles y dependen principalmente de la presión parcial de los gases y del pH sanguíneo. (Álvarez s.f)



La carboxihemoglobina es un componente sanguíneo habitual, ya que el monóxido de carbono es un producto del catabolismo del grupo hemo de la hemoglobina. Es un componente del humo del tabaco, por lo que en los individuos fumadores está fracción aumenta, dependiendo del consumo del tabaco. (Fuentes, 1998)

La carboxihemoglobina (COHB) se forma cuando la hemoglobina entra en contacto con el monóxido de carbono, la afinidad de la hemoglobina por el monóxido de carbono es 218 veces mayor que su afinidad por el oxígeno, y no se modifica. Si existe en el aire índice tóxico de monóxido de carbono y se forma carboxihemoglobina, desciende la cantidad de oxihemoglobina. Como consecuencia de la imposibilidad de la COHB de transportar oxígeno, aparece hipoxia. Si la concentración de carboxihemoglobina es muy alta, la anoxia y los cambios tisulares irreversibles que esta ocasiona, pueden acarrear la muerte. (Miale, 1985)

El Nivel de COHB es un marcador útil para estimar el monóxido de carbono interior, es decir, la dosis que el individuo ha recibido. La cantidad de COHB formada es dependiente de la concentración del contaminante, duración a la exposición al Monóxido de Carbono, ejercicio, temperatura ambiente, estado de salud y metabolismo del individuo. (Ortega y García, 2004)

En la ciudad de Quito en el año 1999, ya se habían reportado concentraciones de partículas en suspensión, superiores a la norma de calidad del aire en los sectores sur y norte de la ciudad y un alto porcentaje de violaciones a la norma de monóxido de carbono (CO). (OPS-OMS, 2006)

Según las estadísticas basadas en mediciones diarias, los valores más altos de CO en la ciudad de Quito se reportan en las estaciones de: Cotocollao, Carapungo, Centro, Guamaní, Los Chillos. (Red de Monitoreo Atmosférico Corporación para Mejoramiento del aire en Quito, REMMAQ. Estadísticas 2014)

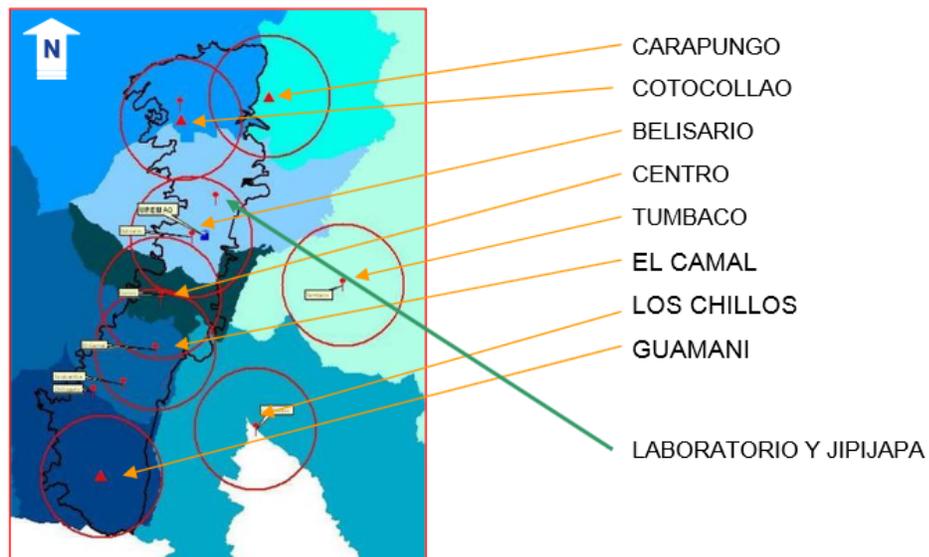


Grafico1: Localización de las estaciones de monitoreo de la REMMAQ y área de influencia. Fuente: REMMAQ

Los fumadores son otra población en riesgo ya que la formación de carboxihemoglobina ofrece una dificultad para ceder el Oxígeno a tensiones bajas, en este respecto es interesante recalcar que si una persona fuma un cigarrillo cada 30 minutos la concentración de carboxihemoglobina sube hasta llegar a un nivel cercano al 7%, lo cual equivale a una disminución aproximada de un 20% de la tensión del oxígeno de la sangre venosa. (Torres, 2001)

En este contexto, es importante validar y tomar en cuenta el método analítico para la determinación de la COHB y que este sea estandarizado, aplicando la Norma UNE-EN ISO 17025:2005, la cual argumenta: “La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. El laboratorio debe validar los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto” este procedimiento garantiza la calidad de la información analítica, la trazabilidad en las medidas y la comparabilidad de los resultados. (Anexos 3, 4,5)

2 EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según estudio de la calidad del aire realizado por la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud OPS-OMS; la contaminación ambiental en Quito por monóxido de carbono “desde 1999 a 2003, las concentraciones de CO han aumentado

progresivamente hasta sobrepasar los valores máximos promedio móvil de 8h (9 ppm) y 1h (35 ppm), respectivamente”. (Escalante, s.f)

Las emisiones de monóxido de carbono en la ciudad de Quito son en su mayoría provenientes del tráfico vehicular. Las mayores concentraciones se las encuentra en horas y meses con menores temperaturas, debido a un mayor efecto de los arranques en frío. Para el año 2013, los meses con mayores concentraciones de monóxido de carbono en el aire ambiente son los meses de abril y noviembre, donde se reportaron las menores temperaturas entre las 6 y 7 de la mañana. La menor concentración por el contrario se reporta en el mes de julio, correspondiente a las vacaciones de escuelas y colegios, hecho que disminuye significativamente el tráfico vehicular en la ciudad. (Secretaria del ambiente, Informe de la calidad del aire de Quito del 2013)

Como afirma Páez C. en su publicación *Gestión de la contaminación atmosférica urbana: El caso de Quito*. Existen 4 características básicas que deben resaltarse:

- “Su altitud. En efecto, el estar situada a 2800 metros sobre el nivel del mar, en promedio, hace que el aire de Quito tengan naturalmente menos oxígeno, lo cual conspira contra la eficiencia de la combustión, que hace que los equipos que queman combustibles fósiles, como los generadores o incineradores industriales o los motores de los vehículos, consuman mayor cantidad de combustible y paralelamente, generen mayor cantidad de contaminantes, en comparación con proceso similares que se realizan en el llano, a nivel del mar. Para señalar algún dato más cuantitativo que ilustre esta afirmación, se anota que según las estimaciones hechas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2006), a mayores altitudes los vehículos a gasolina con carburador, emiten hasta 40% más monóxido de carbono y hasta 20% más hidrocarburos, que cuando operan a nivel del mar, y esto considerando que en los Estados Unidos la ciudad grande que se encuentra más alto es Denver, en Colorado, a tan solo 1400 metros sobre el nivel del mar, frente a los más de dos mil de las ciudades ecuatorianas de altura”.

- “La topografía de la zona en que se asienta Quito, que presenta la forma de una cuenca que tiene en las elevaciones del ramal occidental de la cordillera de Los Andes, el macizo del Guagua y el Ruco Pichincha, una especie de barrera natural que limita la libre circulación del viento y consecuentemente, la capacidad de la atmósfera de dispersar los contaminantes. Este fenómeno común de las ciudades que están en valles; es decir su baja ventilación, hace que Quito, salvo los meses muy secos de mediados del año, tenga vientos promedio de entre uno y dos metros por segundo, bastante más bajos que los que experimentan poblaciones localizadas en amplias sabanas como Bogotá por ejemplo, o en planicies extensas como Guayaquil”.
- “Su situación ecuatorial, ya que ello hace que casi todo el año se tengan altos niveles de luminosidad, que favorecen la ocurrencia de las reacciones fotoquímicas que originan el smog, uno de los íconos de la modernidad en los centros urbanos”.
- “Su proximidad a volcanes en actividad, como el ya mencionado Guagua Pichincha o El Reventador, que queda a unos 100 kilómetros al oriente, que en los últimos años han alertado con sendas erupciones que provocaron los peores episodios de contaminación atmosférica en la ciudad, en octubre de 1999 y particularmente en noviembre del 2002, respectivamente, con valores hasta 10 veces más altos que los registrados cotidianamente en ausencia de esos eventos (Ecogestión 2008)”.

La Red Metropolitana de Monitoreo Atmosférico (REMMAQ) se originó en 1994 y tiene como finalidad producir datos confiables sobre la concentración de contaminantes atmosféricos el desarrollo del índice Quiteño de la Calidad del Aire (IQCA), el cual está basado en la interacción de los cinco parámetros de calidad del aire de la red; entre ellos el Monóxido de Carbono (CO). (Plan Nacional de la Calidad del Aire, 2010) y que sirve como insumo para la planificación, formulación, ejecución y evaluación de políticas y acciones orientadas al mejoramiento de la calidad del aire.

En efecto, según una estimación luego del primer año de aplicación de la revisión vehicular obligatoria, para el caso del monóxido de carbono se consiguió un ahorro de entre el 15 y el 35% de las emisiones totales, en comparación con el escenario en el que no hubiese sido aplicada la medida. Para el caso de los hidrocarburos no combustionados, ese ahorro fue estimado entre el 21 y el 36% (CORPAIRE, 2004).

En términos de la variación anual, los reportes de la REMMAQ marcan una tendencia a la baja decreciente de las emisiones de CO, estando en el 2007 en valores alrededor de $0.5\text{mg}/\text{m}^3$, en lo que respecta a los promedios de 1 y 8 horas. (Plan Nacional de la Calidad del Aire, 2010)

A nivel internacional, la Organización Mundial de la Salud (OMS) emite directrices sobre Calidad del Aire, las mismas que constituyen el análisis más consensuado y científicamente respaldado sobre los efectos de la contaminación en la salud y en las que se incluyen los parámetros de calidad del aire que se recomiendan para una disminución significativa de los riesgos sanitarios. En base al criterio anterior la referencia nacional obligatoria para evaluar el estado de la contaminación atmosférica constituye la Norma de Calidad del Aire Ambiente (NECA), publicada como constituyente del Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria (TULAS) (libro VI De La Calidad Ambiental Anexo 4). LA NECA establece como límite máximo permisible para el CO $10\text{mg}/\text{m}^3$ Concentración en 8 horas consecutivas. (Secretaria del ambiente, Informe de la calidad del aire de Quito del 2013)

El monitoreo de la exposición a monóxido de carbono, se puede realizar a través de la determinación de biomarcadores y medición de concentraciones ambientales. Carboxihemoglobina en sangre, es un biomarcador de exposición de alta especificidad, refleja la dosis interna de monóxido de carbono en sangre. También se considera un biomarcador de

efecto precoz en cuanto refleja alteraciones bioquímicas y fisiológicas en la estructura de la hemoglobina y en el proceso fisiológico de oxigenación celular y tisular. (Téllez, 2006)

Resultados de una investigación realizada por el Posgrado de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Central para determinar los niveles de carboxihemoglobina, un indicador biológico de concentración por monóxido de carbono, en la sangre de niños en edad escolar de la ciudad de Quito y la incidencia de infecciones respiratorias determinó que entre el 2000, año en que se realizó un primer estudio y el 2007, en que se hizo el nuevo análisis, los niveles se han reducido ostensiblemente, pasando de 5.1% en los niños que se educan en el Centro Histórico a 1.8% y de 2.5% para los niños de Carcelén, al norte de la ciudad, a 1.9%; además, el porcentaje de niños con niveles inseguros de carboxihemoglobina pasó de 92 a 3.3 en el Centro y de 43 a 7 en el sector norte (Flores, 2008; Paredes, 2008).

En la actualidad los laboratorios analíticos deben validar y estandarizar las metodologías de sus ensayos con la finalidad de obtener resultados confiables y reproducibles (UNE-EN ISO 17025:2005), especialmente en la medición de la carboxihemoglobina, siendo un indicativo de afectación a la salud humana por exposición a la contaminación ambiental en la ciudad de Quito.

La cuantificación de dicho analito (COHB) sin alguna metodología estandarizada, generaría resultados poco fiables. Diferentes organismos europeos y americanos como la FDA (Food and Drug Administration) y EPA (Environmental Protection Agency) relacionados con las buenas prácticas de laboratorio (GLP), recomiendan que los métodos analíticos sean sometidos a estudios, o validación, para demostrar que los datos obtenidos a partir de diferentes métodos aplicados sean aceptables para el fin que se pretende. (Sierra et al., 2010)

2.2 DIAGNOSTICO DEL PROBLEMA

La determinación analítica de la carboxihemoglobina en sangre total según afirma Repetto (2009) puede realizarse por espectrofotometría visible, con una correlación aproximada entre la concentración de COHB, expresada como porcentaje en relación con la hemoglobina total y la situación circunstancial y, clínica del sujeto, presenta las siguientes relaciones:

- <2%: no fumadores, vecinos rurales,
- 2-4%: vecinos urbanos
- 5-10% fumadores
- 12-20% intoxicación leve a moderada, cefaleas, etc. (simula gripe)
- 20-30% intoxicación aguda (simula intoxicación etílica)
- 50-70% coma,
- >70%: muerte rápida. (Repetto, 2009)

Los efectos de la exposición prolongada a concentraciones menores, conducen a intoxicación crónica, dependen de varios factores como la concentración del gas en el ambiente, el tiempo de exposición y eventualmente la cronicidad de la exposición. Un nivel bajo de carboxihemoglobina entre 2,4 y 4,3% ya produce una disminución de la capacidad de trabajo, lo cual puede tener implicaciones en la salud de la población general, en lo que se refiere al acortamiento potencial de ciertas actividades profesionales recreativas o con alguna exigencia física. (Ortega, 2004)

Por lo que valores errados en las mediciones de COHB podrían generar problemas de salud y de productividad.

2.3 PRONÓSTICO

En caso de realizarse mediciones de COHB con métodos de ensayo sin validación, se pueden generar resultados no confiables o erróneos, lo que llevaría a ocultar o desconocer sintomatologías importantes que pueden afectar el estado de salud de las personas.

Un estudio de esta naturaleza consiste en una serie de experimentos específicamente diseñados para tal evaluación, el método sometido a validación debe escribirse explícitamente para evitar cualquier ambigüedad, será llevado a cabo por un analista experimentado que efectuará réplicas y evaluará los errores y posibles desviaciones del método. (Valcárcel, 2002)

2.4 CONTROL DE PRONÓSTICO

Por medio de análisis estadísticos, las exigencias de validación de estos métodos a efectos de cumplimiento de las normas, incluyen estudios de repetibilidad, reproducibilidad, rango, límite de detección, límite de cuantificación. (Sierra et al., 2010) asegurando que a partir de los resultados con precisión, los diagnósticos son más acertados y a futuro serán un insumo en estudios para la generación de política pública.

2.5 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La validación del método de medición de COHB permitirá obtener resultados fiables?

2.6 SISTEMATIZACION DEL PROBLEMA

- ¿Cuáles son los criterios para definir la vulnerabilidad de la población a estudiar?
- ¿Cuál es el procedimiento para validar el método analítico para determinación de COHB?

- ¿Cómo se cuantifica una muestra para la medición de la población vulnerable?
- ¿Cuáles son los aspectos socio ambientales para evaluar el nivel de afectación de la población vulnerables?

2.7 OBJETIVO GENERAL

Medir la concentración de COHB en 3 poblaciones vulnerables en la ciudad de Quito

2.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar el Método analítico para determinación de COHB
2. Cuantificar las muestras de las poblaciones vulnerables

2.9 JUSTIFICACIONES

Por análisis toxicológicos se entiende el conjunto de procesos analíticos encaminados a poner en manifiesto la presencia de una sustancia considerada tóxica en una muestra. Del área fundamental de toxicología analítica se derivan varias ramas, entre ellas la toxicología analítica ambiental. En cualquier eventualidad clínica el diagnóstico de la intoxicación debe apoyarse en el análisis de laboratorio, no sólo para descubrir o confirmar el agente etiológico, sino también para, dentro de lo posible, evaluar procesos de impregnación eliminación y eficacia del tratamiento aplicado. Nogué (1983) citado por Repetto (1983).

La concentración del producto en las muestras del intoxicado son generalmente más bajas en los casos clínicos (especialmente en las intoxicaciones subagudas y crónicas, y en pacientes sometidos a tratamiento depurador) que en los casos forenses (generalmente intoxicación

subagudas y crónicas y en pacientes sometidos a tratamientos depurador) que en los casos forenses (generalmente de intoxicación sobreaguda y muerte inmediata). (Repetto, 2009)

La determinación del tóxico en los casos forenses puede ser de carácter cualitativo o semi cuantitativo, pues suele ser suficiente encontrar en el medio orgánico un xenobiótico para llegar al diagnóstico, mientras que con fines clínicos normalmente es necesaria la determinación cuantitativa para evaluar el grado de impregnación y gravedad de la intoxicación, de donde deducir las medidas terapéuticas más convenientes. Consecuentemente, el laboratorio de toxicología clínica debe proporcionar los resultados con rapidez, exactitud y precisión, lo que exige tener métodos, rápidos, sensibles y específicos (Repetto, 2009)

Las normativas más antiguas destinadas a garantizar la calidad de los resultados de análisis toxicológicos son probablemente las del comité Olímpico Internacional, después la Sociedad de Toxicólogos Forenses norteamericanos y la administración americana sobre drogas de abuso (DEA); finalmente la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT) ha publicado sus recomendaciones en el año de 1994, con el compromiso de ser revisadas, por la gran preocupación actual por la fiabilidad de resultados, se están extremando las exigencias del cumplimiento de los Códigos de Buenas Prácticas de Laboratorio de las Normas de Garantía de Calidad y de la acreditación de los laboratorios y de su personal, y en el momento actual, La norma UNE-EN ISO 17025, ya que sin cuya estricta observancia de todas ellas, los informes analíticos corren el riesgo de ser rechazados. (Repetto, 2009)

2.10 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ÁREA DE ESTUDIO

Se eligieron las poblaciones; Centro Histórico (Quito) que según datos del año 2013 de los promedios móviles de 8 horas presenta un valor de 1.06 mg/m³ y Guamaní (sur de Quito) con valores del año 2013 de los promedios móviles de 8 horas presenta un valor de 0.81 mg/m³; datos del informe calidad del aire DMQ2013.xlsx Elaborado por Valeria Díaz el 9 abril del 2014 de la Red de Monitoreo Atmosférico Corporación para Mejoramiento del aire en Quito, REMMAQ. Adicionalmente un grupo de fumadores quienes además de ser un grupo altamente vulnerable, también sirve como un indicador de la presencia del analito. Como grupo control, se eligió pobladores de la Parroquia rural Nono.

Las estaciones de medición están ubicadas en el Centro histórico en la terraza de la radio Municipal (ex Hogar Javier, García Moreno y Sucre), en Guamaní está ubicada en la escuela Julio Enrique Moreno (Patricio Romero S/N y Lucía Albán) la medición de CO por la REMMAQ es hecha con un equipo Thermo 48C de Absorción infrarrojo no dispersiva usando correlación de filtro de gas (Método de referencia EPA No RFCA-0981-054).

No se cuentan con datos de Medición de CO en la Parroquia de Nono.

2.11 DEFINICIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO EN EL ÁREA DE ESTUDIO

Mediante las estadísticas presentadas por la Red de Monitoreo Atmosférico Corporación para Mejoramiento del Aire en Quito, REMMAQ 2013, se puede llegar a tomar y determinar el tipo de población que se requiere para realizar el estudio; las personas que residen en los sectores Centro, Centro-Sur de Quito están expuestas a un nivel mayor de contaminación, ya que el aire en estos lugares tiene una concentración significativa de CO. Las muestras fueron de 30

muestras en el sur de Quito, 80 en el Centro Histórico, así mismo se midieron a 59 fumadores y 20 personas en la Parroquia de Nono.

CAPÍTULO II

3 MARCO TEORICO

El monóxido de carbono es el contaminante atmosférico más común y su exceso se debe principalmente al uso de motores que emplean gasolina, en los Estados Unidos de Norteamérica, anualmente se emiten más de 100 toneladas de CO, cifras que dependen del número y velocidad de circulación, capacidad de sus motores, la temperatura ambiental, del combustible utilizado y de la dispersión atmosférica del contaminante. (Rico F. s.f)

Se considera que 30 ppm monóxido de carbono en la atmosfera no causan efectos biológicos, aun durante lapsos prolongados. Las poblaciones urbanas suelen estar expuestas a 50 o 60 ppm de CO, en los estacionamientos cerrados hasta 150 ppm de CO. La concentración sanguínea arterial de monóxido de carbono es 2% en individuos normales habitantes de las grandes ciudades, un fumador que inhala una o dos cajetillas de cigarrillos al día tiene un 10% de monóxido de carbono y de un 5 a 9% de los fumadores pasivos. (Rico F. s.f)

Cuando la concentración de monóxido de carbono es menos de 100 ppm, la carboxihemoglobina en sangre arterial está en relación: $HBCO (\%) = 0.35 \times CO (\text{ppm})$ ó bien $HBCO (\%) = 0.16 CO (\text{ppm})$. Estas ecuaciones son válidas sólo cuando la concentración de monóxido de carbono atmosférico permanece invariable y en equilibrio con la hemoglobina. (Rico F. s.f)

La magnitud en la combinación del monóxido de carbono con la hemoglobina depende directamente del porcentaje de oxígeno de aire inspirado, de la presión barométrica y de las

características fisiológicas del individuo expuesto al gas (ventilación, volumen circundante, espacio muerto, difusión pulmonar, etc.) (Rico F. s.f)

La técnica usada para la determinación de COHB fue espectrofotométrica, que según Quesada (2007) es un análisis cuantitativo, que se basa en la capacidad de las sustancias de absorber la luz, a una longitud de onda (λ) determinada, en proporción directa a la cantidad de materia presente. Mediante el espectrofotómetro se obtiene una medida del valor de la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda; los espectrofotómetros presentan cinco componentes básicos:

- Una fuente de luz dependiendo del espectro que se trabajará (visible, infrarrojo o ultravioleta), una lámpara común de filamento de tungsteno emite una luz que al pasar por un prisma, se descompone en varios colores.
- Un monocromador para la selección de la longitud de onda que incidirá sobre la muestra.
- Una celda o cubeta para la muestra.
- Un detector para medir la intensidad de la luz transmitida (transmitancia o absorbancia)
- Un sistema de lectura.

Al incidir un haz de luz (L_i) de determinada longitud de onda (λ) sobre una muestra, parte de esta luz es absorbida y la otra parte es reflejada o transmitida (L_t), lo que puede representarse de la siguiente manera:

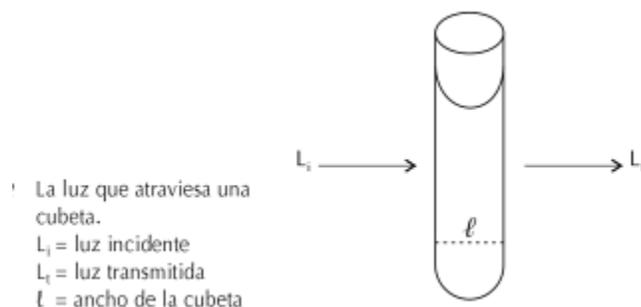


Grafico2: Representación, técnica espectrofotométrica Fuente: Quesada (2007).

La cantidad de luz absorbida por la muestra es directamente proporcional a la concentración de la muestra (a mayor concentración, mayor absorción y menor transmisión) y a la longitud del cuerpo atravesado por el haz (ancho de la cubeta).

El grado de exposición al monóxido de carbono es evaluado mediante la medición de la saturación de Carboxihemoglobina en sangre. Esta medida es relevante para las investigaciones de la intoxicación aguda accidental o deliberada y de la exposición crónica en un lugar de trabajo o el medio ambiente. El grado de exposición a CO se puede medir por la saturación de Carboxihemoglobina en sangre. (Ríos, 2011)

El monóxido de carbono se determina fácilmente en la sangre a partir de la carboxihemoglobina coloreada que se forma con la hemoglobina, usando espectrofotometría de absorción en disolución. El procedimiento consiste en la medición de las absorbancias a determinadas longitudes de onda de una muestra de sangre. Con los cálculos apropiados, puede obtenerse una conversión en porcentaje para la carboxihemoglobina. (Manahan, 2007)

La metodología que fue validada y usada para la medición de Carboxihemoglobina en este trabajo investigativo se basa en la reducción de la Oxihemoglobina y la Metahemoglobina al

agregar Ditionito de Sodio, dando un espectro característico, mientras que la mayor afinidad por el oxígeno que tiene la Carboxihemoglobina, evita que sea reducida, generando dos picos característicos en diferente longitud de onda. Las absorbancias de los pigmentos son medidas a 420 y 432nm, a un pH de 6.85, con absorción de la COHB a 420nm y de la HB a 432nm. (Ríos, 2011)

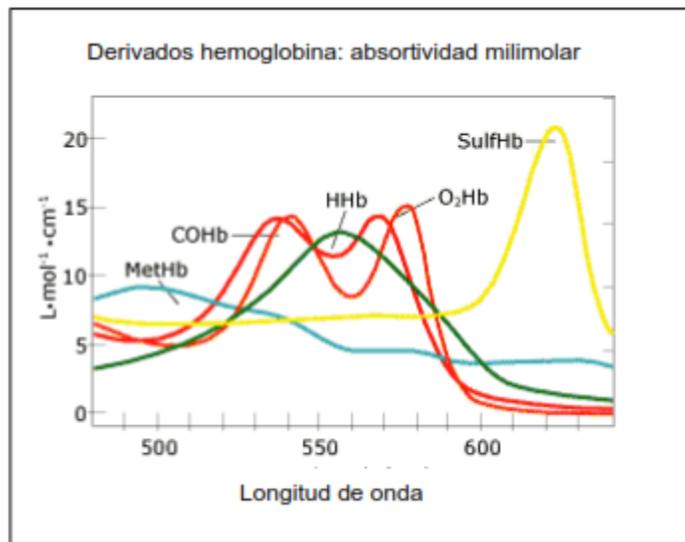


Grafico3: Espectros de absorción de derivados de la hemoglobina. Fuente: Rodríguez (2005).

La técnica espectrofotométrica para determinación de COHB, mediante la reducción con Ditionito de sodio, es sencilla y confiable, se requiere poca cantidad de muestra y ofrece resultados rápidos, por lo que es una herramienta importante en determinación de intoxicaciones agudas por CO. (Ríos, 2011)

El equipo usado fue un Espectrofotómetro UV-Visible modelo: Lambda 25 (Perkin Elmer), en la sección de Toxicología del Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses de Pichincha.

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de las especificaciones, que están

trabajando correctamente, así mismo el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente, con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio. (Eurachem, 1998)

3.1 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA

En lo que concierne al área técnica de laboratorio en el año 2011 en la Universidad Nacional de Colombia, en la Facultad de Medicina en el Departamento de Toxicología la estudiante Diana Shirley Ríos Díaz, elaboró una Tesis para optar al título de Magíster en Toxicología con el nombre de “Validación del método para la determinación de carboxihemoglobina en sangre total por técnica espectrofotométrica con reducción de ditionito de sodio” En conclusión el desempeño del método fue satisfactorio, por lo que puede considerarse como una buena alternativa de cuantificación de Carboxihemoglobina.

En el contexto Sudamericano, en lo referente a estudios ambientales en el 2007 la Agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación con su proyecto “aire limpio” ejecutado conjuntamente por Swisscontact junto a la Escuela Técnica de Salud boliviano-japonés y el Instituto de investigaciones Biomédica de la Universidad Mayor San Simón en la ciudad de Cochabamba en Bolivia se realizó un estudio denominado “Efectos de la exposición prolongada al monóxido de carbono ambiental en población urbana en riesgo” determinándose que la concentración de COHB obtenidas en dos métodos diferentes en la población crónicamente expuesta a emisiones de CO, superan la media esperada en la población.

Existe una asociación significativa entre la exposición diaria prolongada al CO y los niveles de COHB en sangre circulante y es dependiente de las horas de exposición diaria, los síntomas más representativos encontrados en los crónicamente expuestos al CO, fueron cefalea,

dificultades de concentración y sensación de fatiga. Estos hallazgos plantean la posibilidad de modificar los límites permisibles del CO en la ciudad de Cochabamba.

En la ciudad de Quito en el año 2000 se realizó un estudio denominado “Incremento de enfermedades respiratorias en escolares de Quito por contaminación atmosférica de origen vehicular” elaborado por la Fundación Natura y el Municipio Metropolitano de Quito con el auspicio de COSUDE, en dicho estudio se investigaron trastornos respiratorios en escolares y se comparó la incidencia de esta patología con el nivel de exposición a la contaminación vehicular, para ello se usó el nivel de carboxihemoglobina como un biomarcador de exposición. Los niveles de COHB medidos mostraron que los niños que asisten a la escuela ubicada en el centro histórico son los que presentan un mayor nivel de COHB comparados con escuelas ubicadas en los sectores Carcelén y Nayón; no se presentaron casos con niveles neurotóxicos en la escuela rural y solo del 6% en zona urbano periférica, en cambio en el grupo central 70 niños (66%) tuvieron concentraciones de COHB mayores de 5.

Con estos antecedentes y como elemento necesario para proceder a identificar poblaciones vulnerables, validar la metodología analítica para determinación de COHB, cuantificar las muestras obtenidas; se ha procedido a investigar el marco teórico que sustenta la medición de la concentración de carboxihemoglobina en 3 grupos vulnerables en la ciudad de Quito.

3.2 ADOPCIÓN DE UNA PERSPECTIVA TEÓRICA

En los estudios encontrados donde se relaciona contaminación atmosférica con valores de carboxihemoglobina, no se menciona si los análisis fueron realizados con metodologías validadas y estandarizadas, lo que podría generar resultados poco fiables, por consiguiente

podrían desconocerse las patologías que se relacionan a este compuesto (COHB) y generar enfermedades.

La técnica validada con la metodología descrita, podría ser un insumo para futuros estudios ambientales, ocupacionales y en casos forenses.

3.3 MARCO CONCEPTUAL

Carboxihemoglobina:

Es una fracción de la hemoglobina que se forma por la unión reversible del monóxido de carbono a la hemoglobina. Su considerable afinidad es 210 veces superior a la que presenta por el oxígeno, y en consecuencia, es un compuesto bastante estable a las concentraciones de oxígeno. Normalmente la COHB es un componente sanguíneo habitual, ya que el monóxido de carbono es un catabolismo del grupo hemo de la hemoglobina. Se puede encontrar valores elevados de la fracción en otras situaciones como en los fumadores. (Fuentes, 1998)

Grupos vulnerables:

Corresponde a una parte de la población afectada, para la cual se plantea la solución del problema, las autoridades o responsables de un proyecto deben procurar que la solución que se plantee llegue a esta población afectada y se convierta en población objetivo. (Miranda, 2005)

Validación:

Es el procedimiento para demostrar que el método analítico es aceptable para el fin que se pretende, en química, las exigencias de validación de un método, a efectos de cumplimiento de normas, comprenden estudios de: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, robustez. (Harris, 2003)

Estandarización:

Es la manera como se registra todo lo concerniente a un trabajo, se detalla cómo se hace, como se lleva a cabo un ajuste, o una inspección. Estos estándares se puede entender como: métodos, procedimientos, normas, instructivos, etc. En general la estandarización es todo aquello que está documentado y norma el comportamiento del personal involucrado. (Pulido, 2003)

CAPÍTULO III

4 METODOLOGIA

4.1 Modalidad de investigación

Se realizará la modalidad de *investigación de campo* ya que su desarrollo será en un laboratorio específico para muestras que generarán datos recogidos directamente de los sitios donde se encuentra el objeto de estudio o población vulnerable.

4.2 Diseño Experimental

Esta investigación es de nivel *explicativo* ya que se basará en hechos y resultados a causas de eventos físicos como son los análisis de las muestras en estudio permitiendo relacionar con un proceso de causa-efecto, además también esta investigación es de carácter *correlacional* por considerarse necesario basarse en otras teorías con la finalidad de establecer y clarificar los procesos metabólicos a través del método de medición de COBH en el cuerpo humano.

4.3 Selección de instrumentos de investigación

El instrumento elegido para la investigación será la *experimentación* ya que se analizará lo establecido en las variables independientes los instrumentos de investigación que se van a utilizar son: toma de muestra, tratamiento y procesamiento, análisis de muestra y estandarización.

4.4 Hipótesis

Ha: La validación del método de medición de COHB es fiable para determinar la concentración de COHB en el grupo de personas vulnerables en la ciudad de Quito

5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VARIABLES

5.1 VARIABLE DEPENDIENTE:

Concentración de COHB:

Esta variable permitirá identificar y conocer el nivel de presencia de COHB que tendrían las personas luego de la validación del método de medición, y conocer cuántos individuos dentro de la muestra presentan niveles altos del analito.

Esta variable permitirá identificar y conocer el nivel de monóxido de carbono en la sangre en tres grupos vulnerables de la ciudad de Quito.

5.2 VARIABLE INDEPENDIENTE:

Grupos de personas vulnerables de la ciudad de Quito

Esta variable permitirá identificar los grupos de personas vulnerables, seleccionadas donde se evidencie que las personas están expuestas a los valores más altos de CO en la Ciudad de Quito.

5.3 VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS

Toma de muestra:

Acudir al grupo seleccionado y obtener la muestra mediante la punción venosa en tubo de ensayo con anticoagulante (heparina) evitando la entrada de burbujas a la jeringa y sin dejar cámara de aire en el tubo.

Determinación analítica

Procesamiento de las muestras y posterior análisis por espectrofotometría UV-VIS.

Método 1: Por reducción con Ditionito de Sodio; cuando se agrega dicho compuesto como agente reductor a la sangre tanto la oxihemoglobina como la metahemoglobina pasan a la forma reducida, dando un espectro característico mientras que la mayor afinidad por el oxígeno que tiene la carboxihemoglobina, evita que sea reducida, generando dos picos de diferente longitud de onda.

Se compara el método validado con una segunda metodología, técnica empleada en el INSPI, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.

Método 2: Saturación con CO se basa en la observación de los espectros de absorción de la O₂HB y COHB cuando la sangre se trata con una sustancia reductora como el sulfhidrato amónico ya que la O₂HB pasa a HB reducida, cuyo espectro está formado por una banda ancha y única; mientras que la COHB no se modifica por el reductor, conserva las dos bandas y consiste en la determinación de las absorbancias a longitudes de onda características.

5.4 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO:

Técnica:

Espectrofotométrica.

5.4.1 Método 1:

Reducción con Ditionito de Sodio según descripción de Ernest Beutler y Carol West.

Reactivos:

- Ditionito de Sodio; Merck, Lote K45959907504.
- Dihidrogenofosfato de Potasio K_2HPO_4 ; Merck, Lote AM041990431
- Fosfato de Potasio Monobásico KH_2PO_4 ; Panreac. Lote 223333
- Formiato de Sodio $HCOONa$; Merck, Lote AO703343429
- Acetato de Sodio Trihidratado $CH_3COONa \cdot 3H_2O$; Merck, Lote AM0586167445
- Ácido Acético $C_2H_4O_2$; Fisher Chemicals, Lote 100915
- Ácido Sulfúrico H_2SO_4 ; Fisher Chemicals, Lote 062556

Preparación de reactivos:

- Buffer: Preparar una solución 0.1 mol/L K_2HPO_4 / KH_2PO_4 pH= 6.85
- Solución hemolizante: Diluir el Buffer 1:10 con agua desionizada.
- Solución diluyente de COHB: Agregar 25 mg de Ditionito de Sodio en 20 mL del Buffer justo antes de usar.

Procedimiento:

1. Extraer la sangre venosa a los pacientes en un tubo vacutainer que contengan anticoagulante (Heparina de sodio o EDTA). (Anexo 1)
2. Dejar que lleguen a temperatura ambiente.
3. Medir 12 ml de la solución hemolizante en un tubo de ensayo y agregar 100 μ L de la muestra de sangre, homogenizar. (Anexo 2)
4. Dejar en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos.

5. Medir 2.3mL de solución diluyente de COHB en un tubo de ensayo y adicionarle 100uL del hemolizado, mezclar. (Anexo 2)
6. Dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
7. Leer las absorbancias a 420 y 432nm, utilizar como blanco la solución diluyente de COHB. (Anexo 4)
8. Para obtener los valores medio y alto de carboxihemoglobina la sangre fue contaminada artificialmente mediante burbujeo de monóxido de carbono a través de un generador de CO. (Anexo 2)

Cálculos:

- Se usa la siguiente ecuación para calcular la fracción de COHB:

$$3) \%COHB = \frac{1 - (A_R \times F_1)}{A_R(F_2 - F_1) - F_3 + 1}$$

- A_R es el radio A_{420}/A_{432} del hemolizado en solución diluyente de COHB
- $F_1 = 1.3330$
- $F_2 = 0.4787$
- $F_3 = 1.939$
- Las constantes $F_1 F_2 F_3$ son calculadas de las absorbancias molares de la COHB a 420 y 432nm

5.4.2 Método 2:

INSPI - Reducción con sulfhidrato amónico

Reactivos:

- Ácido Sulfúrico H_2SO_4 ; Fisher Chemicals, Lote 062556
- Formiato de Sodio $HCOONa$; Merck, Lote AO703343429
- Ácido Acético $C_2H_4O_2$; Fisher Chemicals, Lote100915
- Acetato de Sodio Trihidratado $CH_3COONa \cdot 3H_2O$; Merck, Lote AM0586167445

Preparación de reactivos:

- Solución aceto – acética (1:3) (A+B) pH 5.05
- A: Ácido acético glacial 30% v/v
- B: Acetato de sodio trihidratado 40,8%

Procedimiento:

1. Medir 5ml de sangre (muestra), colocar en un erlenmeyer de 50 ml con tapa esmerilada, agregar 15 ml de agua desionizada.
2. Separar la mitad del volumen obtenido en un recipiente similar.
3. Preparar el generador de CO, colocar aproximadamente 1 gramo de formiato de sodio en el recipiente del generador, hacer gotear lentamente ácido sulfúrico concentrado y aplicar calor suave, (generación de CO).
4. Saturar una de las fracciones con CO por 30 min.
5. Colocar 4 tubos de 15ml con 4 ml de solución aceto-acética cada uno.
6. Agregar en dos de ellos 1 ml de la solución sanguínea (muestra sin tratar con CO).
7. En los otros dos tubos añadir 1 ml de la muestra tratada con CO.

8. Mezclar, colocar en baño María a 55 °C por 5 minutos.
9. Enfriar en chorro de agua por 5 minutos y centrifugar por 5 minutos a 5000 RPM.
10. Colocar 2ml de cada sobrenadante en un tubo de 15ml y añadir 10ml de agua destilada y mezclar por inversión.
11. Realizar las lecturas, utilizando cubetas diferentes para el blanco, sangre problema y sangre tratada con CO.
12. Determinar las absorbancias de cada uno a 570 nm y 630 nm, utilizando como blanco agua destilada.

Cálculos:

- Se usa la siguiente ecuación para calcular la fracción de COHB:

$$\%COHB = \frac{A_{507} - A_{630} \text{ (muestra no tratada con CO)}}{A_{507} - A_{630} \text{ (muestra tratada con CO)}}$$

A_{507} : Absorbancia a 507nm

A_{630} : Absorbancia a 630nm

5.5 Diseño de la validación:

Basado en: *A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Eurachem, 1998

Límite de Detección:

Es la determinación de la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad que puede detectarse confiablemente por el método. (Eurachem, 1998)

Límite de Cuantificación:

Es estrictamente la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión. (Eurachem, 1998)

Exactitud:

Expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero, normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: veracidad y precisión. (Eurachem, 1998)

Veracidad:

La evaluación de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir se determina contra un valor de referencia, puede ser material caracterizado o de otro método caracterizado. Para verificar con respecto a un método alternativo, se comparan los resultados de los métodos para la misma muestra. (Eurachem, 1998)

Precisión:

Las medidas de precisión más comunes son la **repetibilidad** y la **reproducibilidad**, éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. (Eurachem, 1998)

Repetibilidad:

Es la precisión más pequeña esperada, da una idea de la clase de variabilidad esperada ejecutada por un analista, con un equipo, en un corto tiempo. (Eurachem, 1998)

Reproducibilidad:

Es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto al tiempo, por ejemplo la precisión medida entre diferentes analistas, dentro de un solo laboratorio. (Eurachem, 1998)

Varianza:

Esta medida nos permite identificar la diferencia promedio que hay entre cada uno de los valores respecto a su punto central (Media). Este promedio es calculado, elevando cada una de las diferencias al cuadrado (Con el fin de eliminar los signos negativos), y calculando su promedio o media; es decir, sumado todos los cuadrados de las diferencias de cada valor respecto a la media y dividiendo este resultado por el número de observaciones que se tengan. (Levin, 2004)

Desviación estándar:

Esta medida nos permite determinar el promedio aritmético de fluctuación de los datos respecto a su punto central o media. La desviación estándar nos da como resultado un valor numérico que representa el promedio de diferencia que hay entre los datos y la media. Para calcular la desviación estándar basta con hallar la raíz cuadrada de la varianza. (Levin, 2004)

Coefficiente de variación:

El Coeficiente de variación (CV) nos indica si la distribución está concentrada en torno a la media, independientemente de la escala que usemos; es una medida de la dispersión relativa de un conjunto de datos, que se obtiene dividiendo la desviación estándar del conjunto entre su media aritmética y se expresa generalmente en términos porcentuales. (Levin, 2004) (Sábado, 2009)

Coefficiente de asimetría:

Es una medida de descripción de la población, donde como su nombre lo indica es el mayor o menor grado de asimetría de la distribución. Un coeficiente de asimetría nulo corresponde casi siempre a una distribución simétrica, es posible (pero raro) que una distribución asimétrica tenga nulo el coeficiente de asimetría. (Bertram, 1976)

Cálculo de varianza y desviación estándar:

A. Varianza :

$$s^2 = \frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{\Sigma x^2}{n - 1} - \frac{n\bar{x}^2}{n - 1}$$

B. Desviación estándar:

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n - 1} - \frac{n\bar{x}^2}{n - 1}}$$

C. Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

D. Coeficiente de asimetría:

$$\frac{(1/n) \Sigma(X_i - \bar{X})^3}{\sigma^3}$$

s^2 = Varianza de la muestra

s = Desviación estándar de la muestra

X = Valor de cada una de las n observaciones

\bar{x} = Media de la muestra

$n-1$ = Número de observaciones de la muestra menos 1

Prueba F:

Se establecen las siguientes hipótesis:

$H_0 = \text{Si } F_{\text{exp}} > F_{\text{crit}}$ existe diferencia significativa entre las varianzas, por lo tanto no son homogéneas.

$H_1 = \text{Si } F_{\text{exp}} \leq F_{\text{crit}}$ no existe diferencia significativa entre las varianzas, por lo tanto son homogéneas.

Las varianzas homogéneas significan que la reproducibilidad del laboratorio es adecuada.

6 ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

6.1 RECURSOS HUMANOS

Toma de muestras: Un investigador de apoyo del LCCF

Documentología: Un investigador de apoyo del LCCF

Procesamiento de muestras y validación: Un Investigador principal y un asistente de investigación del LCCF

6.2 RECURSOS MATERIALES

6.2.1 EQUIPO

- Pipetas Digitales Sartorius (diferentes volúmenes)
- Espectrofotómetro UV-VIS modelo: Lambda 25 (Perkin Elmer)
- Balanza analítica Thermo scientific Star A211
- Generador de monóxido de carbono
- Baño María a 55°C Thermo scientific UM 1347002
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Tubos de ensayo
- Tubos toma de muestras con anticoagulante
- Agujas
- Torundas
- Coolers transporte de muestras

CAPÍTULO IV

7 RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO PARA DETERMINACIÓN CARBOXIHEMOGLOBINA

Precisión:

Se analizaron 3 niveles de concentración de carboxihemoglobina: nivel bajo, nivel medio y nivel alto, con 5 repeticiones, por tres días consecutivos y por una misma analista.

Un cuarto día se hizo análisis de 3 niveles de concentración de carboxihemoglobina: en los mismos niveles, con 5 repeticiones, por una analista diferente. (**Tabla 1**)

1er día 13 Mayo-2015			2do día 14 Mayo-2015			3er día 15 Mayo-2015			4to día 2da analista 16 Mayo-2015			
Analista:LK						Analista:CC						
Nivel bajo % COHB	Nivel medio % COHB	Nivel alto % COHB	Nivel bajo % COHB	Nivel medio % COHB	Nivel alto % COHB	Nivel bajo % COHB	Nivel medio % COHB	Nivel alto % COHB	Nivel bajo % COHB	Nivel medio % COHB	Nivel alto % COHB	
2,12	26,23	73,95	2,02	26,49	72,58	1,98	26,97	71,77	2,1	26,31	71,45	
1,94	26,98	74,22	2,05	26,28	74,28	1,77	26,67	71,43	1,87	27,05	75,63	
1,93	26,86	72,89	2,06	25,79	75,46	1,96	25,73	76,44	1,98	26,77	75,15	
2,67	26,93	68,29	1,99	26,16	74,02	1,72	26,83	72,13	1,96	26,44	76,74	
1,86	26,00	71,83	2,04	25,79	67,64	1,84	24,30	73,39	1,98	26,50	72,83	
MEDIA	2,10	26,60	72,24	2,03	26,10	72,80	1,85	26,10	73,03	1,978	26,61	74,36

Tabla 1: Repetibilidad y reproducibilidad Fuente: Cadavid (2015)

Los resultados obtenidos en los 4 días de validación, fueron agrupados por niveles de concentración del analito (COHB), nivel bajo, nivel medio y nivel alto.

En el Nivel bajo se obtiene un coeficiente de variación en la repetibilidad del 9.05% y un coeficiente de variación de 9.05% para la reproducibilidad, valores aceptables ya que se acepta

hasta un CV del 10% en repetibilidad y un CV del 15% en reproducibilidad (según criterios uso de la Ecuación de Horwitz). El CV es más alto que en los otros niveles, comprobando que hay una mayor imprecisión en muestras con más bajos niveles de COHB, sin embargo los datos son consistentes alrededor de la media. (Tabla 2)

NIVEL BAJO						
	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día / 2do analista		
valores de COHB x día	2,12	2,02	1,98	2,1		
	1,94	2,05	1,77	1,87		
	1,93	2,06	1,96	1,98		
	2,67	1,99	1,72	1,96		
	1,86	2,04	1,84	1,98	media total	
media	2,104	2,032	1,854	1,978	1,992	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,16692	3	0,05564	1,713317937	0,204421757	3,238871517
Dentro de los grupos	0,5196	16	0,032475			
Total	0,68652	19				
	Sr	0,180208213	SL ²		0,004633	
	SR	0,180267758				
Coefficiente de variación, repetibilidad y reproducibilidad						
	Cvr	0,09046597	x100=	9,05	%	
	CvR	0,090495863	x100=	9,05	%	

Tabla 2: Coeficiente de Variación nivel bajo Fuente: Cadavid (2015)

En el Nivel medio se obtuvo un coeficiente de variación del 1.09% para la repetibilidad y un CV de 1.09% para la reproducibilidad, valores que son aceptados y que demuestra que en niveles más altos la precisión del analito aumenta y existe menor dispersión de datos. (**Tabla 3**)

NIVEL MEDIO						
26,23	26,49	26,97	26,31			
26,98	26,28	26,67	27,05			
26,86	25,79	25,73	26,77			
26,93	26,16	26,83	26,44			
26,00	25,79	24,30	26,50			
26,6	26,102	26,1	26,614	media total		26,354
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,34492	3	0,114973333	1,398277085	0,2796535	3,238871522
Dentro de los grupos	1,3156	16	0,082225			
Total	1,66052	19				
Sr	0,286749019		SL ²	0,006549667		
SR	0,28682381					
Coefficiente de variación, repetibilidad y reproducibilidad						
Cvr	0,010880664	x100=	1,09	%		
CvR	0,010883502	x100=	1,09	%		

Tabla 3: Coeficiente de Variación nivel medio Fuente: Cadavid (2015)

En el Nivel alto se obtienen coeficientes de variación de repetibilidad de 0.39% y de 0.39% para la reproducibilidad, valores aceptados y que al igual que en el nivel medio demuestra que a medida que aumenta la concentración del analito la dispersión en los datos disminuye y la precisión aumenta. (Tabla 4)

NIVEL ALTO							
73,95	73,95	71,77	71,45				
74,22	74,22	71,43	75,63				
72,89	72,89	76,44	75,15				
68,29	68,29	72,13	76,74				
71,83	71,83	73,39	72,83				
72,236	72,236	73,032	74,36	media total			72,966
ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	0,34492	3	0,114973333	1,398277085	0,2796535	3,238871522	
Dentro de los grupos	1,3156	16	0,082225				
Total	1,66052	19					
Sr	0,286749019		SL ²	0,006549667			
SR	0,28682381						
Coefficiente de variación, repetibilidad y reproducibilidad							
Cvr	0,003929899	x100=	0,39	%			
CvR	0,003930924	x100=	0,39	%			

Tabla 4: Coeficiente de Variación nivel alto Fuente: Cadavid (2015)

Veracidad:

Para determinar la veracidad del método se compara el método validado (Reducción con Ditionito de sodio) con un segundo método (método INSPI, Reducción con sulfihidrato amónico) y se hace un estudio de Prueba F, en este caso se obtuvo valores de F calculada = 1.68 y una F tabulada = 3.633. Donde se dice que “H₁ = si F calculada es menor o igual que F tabulada no existe diferencia significativa entre las varianzas, por lo tanto son homogéneas” (Rivera, 2006), (Tabla 5)

Veracidad			
Método Ditionito		Método Formiato de Sodio	
1	5,94	1	6,18
2	5,69	2	6,29
3	5,7	3	5,98
4	5,72	4	6,31
5	6,14	5	6,24
6	5,82	Var	0,0177
7	5,6		
8	5,65		
9	5,63		
10	5,61		
Var	0,0296		

n1	5	
n2	10	
v1	4	n1-1
v2	9	n2-1
F Cal	1,678	
F Tab	3,633	

Tabla5: Veracidad Fuente: Cadavid (2015)

Límite de Detección y de Cuantificación

Los Límites de Detección y de Cuantificación del método fueron calculados experimentalmente como lo recomienda la guía Eurachem (1998). Para el Límite de Detección se deben medir 10 veces el blanco y a la media obtenida se le suman 3s (Desviaciones estándar), en esta validación el Límite de Detección obtenido es de 0.79%. Para la determinación del Límite de Cuantificación, a la media obtenida se le suman 10s, obteniendo un valor de 1.94% como Límite de Detección, dicho valor puede ser aceptado ya que la tablas de criterio toxicológico inician sus comparaciones a partir del 2% (**Tabla 6**)

Medición	Valor % COHB
1	0,5
2	0,43
3	0,51
4	0,24
5	0,27
6	0,21
7	0,21
8	0
9	0,43
10	0,18
MEDIA	0.298
Desv. estándar	0,164303243
10 S	1,643032427
3 S	0,492909728
Lim Detección	0,79%
Lim Cuantificación	1,94%

Tabla 6: Limite detección y cuantificación Fuente: Cadavid (2015)

7.2 Resultados Mediciones Muestras

Completaron el estudio un total de 189 personas, divididos en cuatro grupos:

POBLACIÓN	NONO	SUR	CENTRO	FUMADORES
Grupo	1	2	3	4
n	20	30	80	59
Media	1,89	2,73	2,59	3,52
Desviación estándar	0,29	0,29	0,51	1,49
Coficiente de asimetría	0,42	0,44	1,86	2,26
Nivel de confianza (95,0%)	0,14	0,11	0,11	0,38

Tabla 7: Resultados medición de COHB en sangre Fuente: Cadavid (2015)

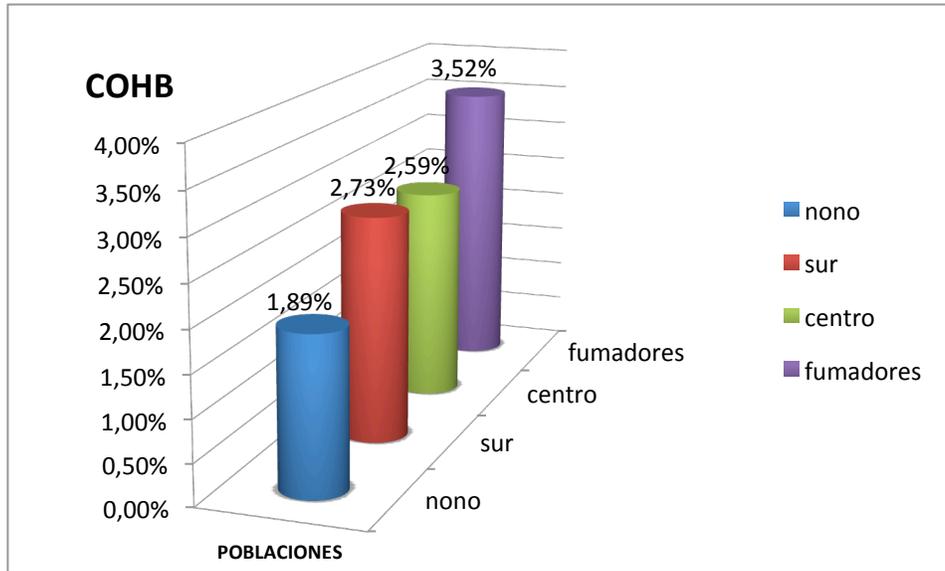


Gráfico 4: Valor media de concentración de COHB en poblaciones Fuente: Cadavid (2015)

Grupo1: Población control

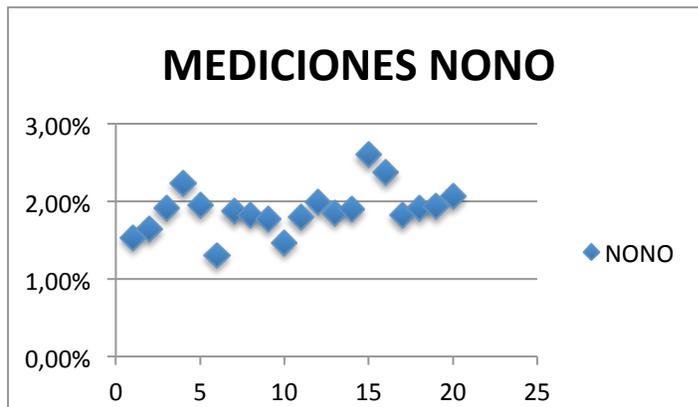


Gráfico 5: Mediciones de COHB en Nono Fuente: Cadavid (2015)

Se realizó toma de muestras a 20 personas de la Parroquia de Nono, ubicada al norte de la ciudad de Quito, con una población de 1455 habitantes; donde hay un bajo índice vehicular y por consiguiente bajas emisiones de CO. Existió dificultad para la obtención de las muestras ya que por razones culturales las personas no se encontraban con buena disposición para la realización del estudio pese a la socialización del mismo.

En esta muestra se encontró una medición baja de COHB (1,89%) este valor está por debajo del Límite de Detección del método (<LD), los resultados están según lo y esperado de acuerdo a lo documentado, donde según Repetto, los habitantes de zonas rurales tendrán mediciones <2%. Cumple lo esperado para población control o blanco. Los datos son consistentes y homogéneos, esto se puede observar en el bajo valor de la desviación estándar. (Tabla 7)

Grupo 2: Población zona expuesta a emisiones de CO, Sur de Quito.

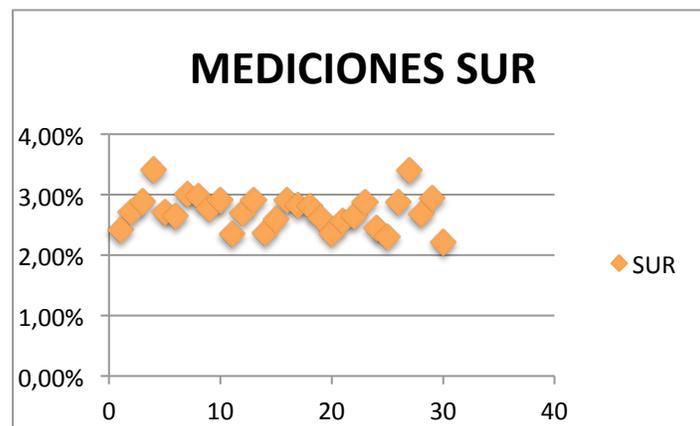


Gráfico 6: Mediciones de COHB en Sur de Quito Fuente: Cadavid (2015)

La segunda muestra fue de 30 personas en el sector de Guamaní ubicada en el sur de Quito con 59.404 habitantes, las muestras fueron obtenidas por intermedio de un laboratorio clínico del sector que facilitó la recolección de las mismas, por lo tanto dependía del número de pacientes atendidos en la clínica que habitaran en este sector específico de la ciudad. En esta población se encontró un valor de 2.73% de COHB, mostrando un aumento en la concentración del analito comparado con la zona rural de la parroquia de Nono, según la comparación con la tabla toxicológica este valor está considerado similar al de fumadores pasivos que presentan entre un 2-4 % de COHB (Repetto, 2009) Los datos son consistentes y homogéneos. (Tabla 7)

Grupo 3: Población zona expuesta a emisiones de CO, Centro Histórico.

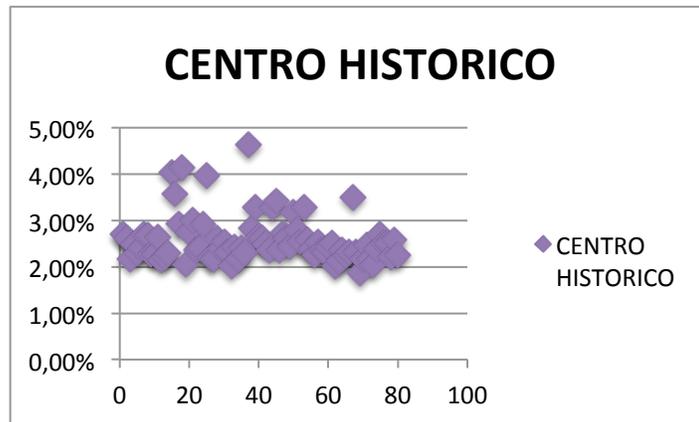


Grafico 7: Mediciones de COHB Centro Histórico Fuente: Cadavid (2015)

La tercera muestra fue de 80 personas del Centro Histórico de Quito con 40.587 habitantes, las muestras fueron obtenidas por intermedio de un laboratorio clínico del sector que facilito la recolección de las mismas, por lo tanto dependía del número de pacientes atendidos en la clínica que habitaran en este sector específico de la ciudad. En esta población se encontró un valor de 2.58% de COHB, mostrando un aumento en la concentración del analito comparado con la zona rural de la parroquia de Nono, pero ligeramente más bajo que en la población de Guamaní, según la comparación con la tabla toxicológica el valor de esta población podría ser considerado similar al de fumadores pasivos que presentan entre un 2-4 % de COHB (Repetto, 2009) Los datos son consistentes y homogéneos. (Tabla 7)

Grupo 4: Población personas fumadoras.

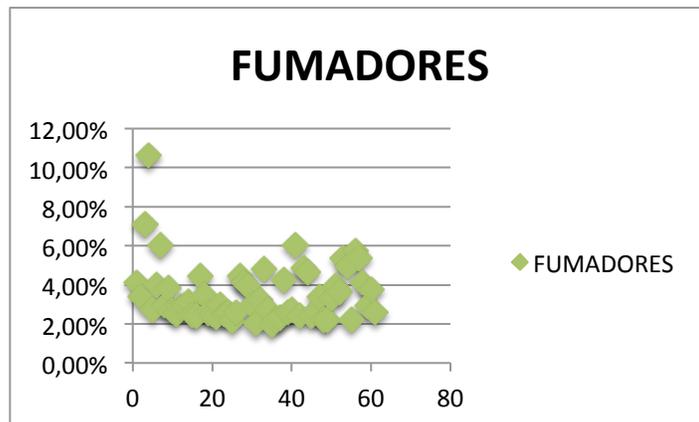


Grafico 8: Mediciones de COHB en Fumadores Fuente: Cadavid (2015)

La cuarta muestra fue de 59 fumadores de una empresa privada, las muestras fueron tomadas directamente en el lugar de trabajo. En esta población se encontró un valor de 3.52% COHB, demostrando un aumento en la concentración de la COHB debido al consumo de tabaco, Los datos en este caso no son homogéneos, esto se puede observar en el valor de la desviación estándar y se da por las diferencias de consumo de cigarrillo ya que van desde los que fuman un cigarrillo con valores de 2.17% de COHB hasta 20 unidades por día con mediciones de 10.62% de COHB. (**Tabla 7**)

CAPITULO V

8 CONCLUSIONES

El método espectrofotométrico validado, ofrece resultados precisos, veraces y rápidos que permitirán tomar decisiones importantes en intoxicaciones por monóxido de carbono.

El método tiene la ventaja de ofrecer resultados confiables con poca cantidad de muestra (100uL), esto de vital importancia en casos forenses.

El método ofrece un límite de detección conveniente para determinaciones en niveles bajos por ejemplo en estudios ambientales y una buena precisión en niveles altos.

El rango de medición en niveles altos permitirá su aplicación en casos forenses de muertes debidas a intoxicaciones por inhalación de monóxido de carbono, y podrá ser usado en el Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses de Pichincha.

Los resultados obtenidos en la población control (Parroquia Nono) 1.89 % COHB, como promedio, corresponden a lo esperado para vecinos rurales (según criterios de tabla toxicológica), dando valores bajos de concentración de COHB.

Los valores obtenidos en las poblaciones del sur y centro de Quito presentan valores normales para moradores de zonas urbanas, están entre 2.59 y 2.73% COHB; sin superar los valores referenciados en la literatura para dichas zonas, posiblemente a que por ejemplo la norma de calidad ambiental para el monóxido de carbono se cumplió en todas las estaciones de monitoreo durante el año 2013.

Estos valores bajos en la medición de COHB, se pueden presentar debido al efecto de la calibración de los vehículos a gasolina por el efecto de la revisión vehicular, a la salida de circulación de vehículos a carburador, reemplazándolos por vehículos catalizados y la mejora en la calidad de los combustibles en el Ecuador.

Si bien los niveles de medición en las zonas de estudio urbanas (centro histórico, Guamaní) son bajos, los valores de carboxihemoglobina entre 2,4 y 4,3% ya producen una disminución de la capacidad de trabajo, lo cual puede tener implicaciones en la salud de la población general por lo que se refiere al acortamiento potencial de ciertas actividades profesionales, recreativas o con alguna exigencia física.

Los fumadores presentan valores más altos de COHB, muy variables de acuerdo al número de cigarrillos que consumen por día, al estado de salud, la práctica de ejercicio; lo que arroja datos desde 2.17 %COHB en un paciente de 37 años que consume 2 unidades diarias hasta 10.62%COHB en un paciente fumador de 54 años que consume 15 unidades por día.

9 RECOMENDACIONES

En el estudio existió dificultad para conseguir las muestras, para haber podido recopilar un mayor número de muestras sería conveniente haber realizado un convenio con alguna institución interesada en la investigación, para una obtenerlas de una manera más eficiente.

La metodología puede ser empleada puede ser usada a futuro como insumo en otros estudios ambientales.

El método también podría aplicarse en estudios de exposición ocupacional, por ejemplo en trabajadores cercanos a chimeneas, calderos, fundiciones de acero, fábricas de papel, plantas productoras de formaldehído, estacionamientos, choferes, bomberos, etc.

Con las mediciones de COHB se puede calcular el índice biológico de exposición (IBE) que se utilizan como indicador en la evaluación de los riesgos potenciales para la salud en el medio laboral. Si las mediciones en muestras obtenidas de un trabajador superan el IBE, la causa del valor excesivo debe ser investigada y adoptar medidas para reducir la exposición.

El índice biológico de exposición (IBE) que se calcula de los valores obtenidos de COHB, tiene como ventaja que el trabajador es la mejor muestra individual de su ambiente de trabajo y, por eso, indicador de su propia exposición, indica la absorción total del agente tóxico por todas las vías de introducción, puede brindar datos relativos a otras exposiciones, además de hábitos individuales, como el tabaquismo, revela características individuales del trabajador en cuanto al sistema enzimático de biotransformación, en el caso de la carboxihemoglobina el Valor Límite Biológico (BLV) es de 3.5% COHB.

La fiabilidad demostrada en las mediciones a valores altos, como en los casos de muerte por intoxicación con monóxido de carbono, puede ser usada como herramienta para resolver casos penales.

Este examen se podrá usar para exploratorias rutinarias o si se sospecha una enfermedad o toxicidad. También se puede usar para determinar si una condición médica está mejorando o empeorando en clínicas, hospitales o centros de salud.

También puede ser utilizado para determinar la efectividad de un plan de tratamiento, en ensayos de laboratorios clínicos.

CAPITULO VI

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación Swisscontact (2007) *Efectos de la exposición prolongada al monóxido de carbono ambiental en población urbana en riesgo*. Impresiones Poligraf. Bolivia.
- Álvarez S. (s.f) *Determinación de carboxihemoglobina en sangre*. Universidad Autónoma de México. México (p.1)
- Bertram L. (1976) *Matemáticas de la fiabilidad*. Editorial Reverté, S.A., España (p.26-27)
- Eurachem (1998) *Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Reino Unido (p.17-27)
- Flores M. (2008). *Contaminantes ambientales provenientes de emisiones vehiculares e infecciones respiratorias agudas en niños escolares de Carcelén. Estudio comparativo años 2000 y 2007*. Tesis de Grado del Posgrado de Pediatría de la facultad de Ciencias Médicas de la universidad central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Fuentes X. (1998) *Biología clínica y patología molecular II Volumen 2*. Editorial Reverté S.A, España (p. 817)

- Fundación natura y el Municipio Metropolitano de Quito con el auspicio de COSUDE (2000) *Incremento de enfermedades respiratorias en escolares de Quito por contaminación atmosférica de origen vehicular.*
- Harris D. (2003) *Análisis Químico Cuantitativo.* Editorial Reverté S.A, España (p. 723)
- Hill, J (1999) *Química para el nuevo milenio.* Editorial Progreso, México (p. 306)
- Levin R. (2004) *Estadística para la administración y economía.* Editorial universidades. México (p. 100-102)
- Manahan S. (2007) *Introducción a la Química Ambiental.* Editorial Reverté S.A, España (p.695)
- Miale J. (1985) *Hematología, Medicina de Laboratorio,* Editorial Reverté S.A, España (pp. 500, 501)
- Ministerio del Ambiente. (2010) *Plan Nacional de la calidad del Aire.* (p 11, 27-29)
- Miranda J. (2005) *Gestión de proyectos.* Editorial Guadalupe Ltda. Colombia (p. 43)
- Norma UNE-EN ISO 17025:2005 (pg. 14)
- OPS/OMS (2006) *Situación de Salud Ecuador 2006.* Obtenido de www.paho.org/ecu/index.php

- OPS-OMS (s.f) *Calidad del aire en la ciudad de Quito*. Obtenido de www.bvsde.ops-oms.org
- Ortega J. (2004) PEHSU Pediatric Environmental Health Speciality Unit Murcia-Valencia. Obtenido de www.pehsu.org/az/pdf-co.pdf
- Paredes L. (2008). *Control de emisiones vehiculares disminuyen la frecuencia de infecciones respiratorias agudas en niños escolares del centro de la ciudad de Quito*. Tesis de Grado del Posgrado de Pediatría de la facultad de Ciencias Médicas de la universidad central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Páez C. (s.f) *Gestión de la contaminación atmosférica urbana: El caso de Quito*. Obtenido www.flacsoandes.edu.ec/web/imagesFTP/10088.ContaminacionQuito.pdf
- Pulido S. (2003) *Manual de Calidad total para operarios, con la norma ISO 9000*. Editorial Limusa S.A, México (p.93)
- Quesada S. (2007) *Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica (p.9-10)
- Repetto M. (2009) *Toxicología Fundamental*, Ediciones Díaz de Santos, España (p. 226-228, 509-512)

- Rico f. (s.f) *Daños a la salud por contaminación atmosférica*, Universidad Autónoma del Estado de México, México (p.108-112)
- Ríos S. (2011) *Validación del método para la determinación de carboxihemoglobina en sangre total por técnica espectrofotométrica con reducción de ditionito de sodio*. (Tesis para optar al título de Magister) Universidad Nacional de Colombia.
- Rivera C. (2006) *Uso de la Ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo NM-EX 17025-IMNC-2006* Simposio de metrología. México (p.2,4) Obtenido de <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>
- Sábado J. (2009) *Fundamentos de Bioestadística y análisis de datos para enfermería*. Universitat Autònoma de Barcelona. España (p.60)
- Sierra I. et al (2010) *Análisis Instrumental Volumen 1*, Editorial Netbiblo, S.L España (p.3)
- Stanley E. (2007) *Introducción a la Química Ambiental*, Reverté Ediciones s. a España (p.408)
- Téllez J. (2010) *Contaminación por Monóxido de Carbono: un Problema de Salud Ambiental*. Revista de Salud Pública. Volumen 8, Número 1. Bogotá
- Torres L. (2001) *Anestesia y reanimación*, Arán Ediciones, España (p, 389)

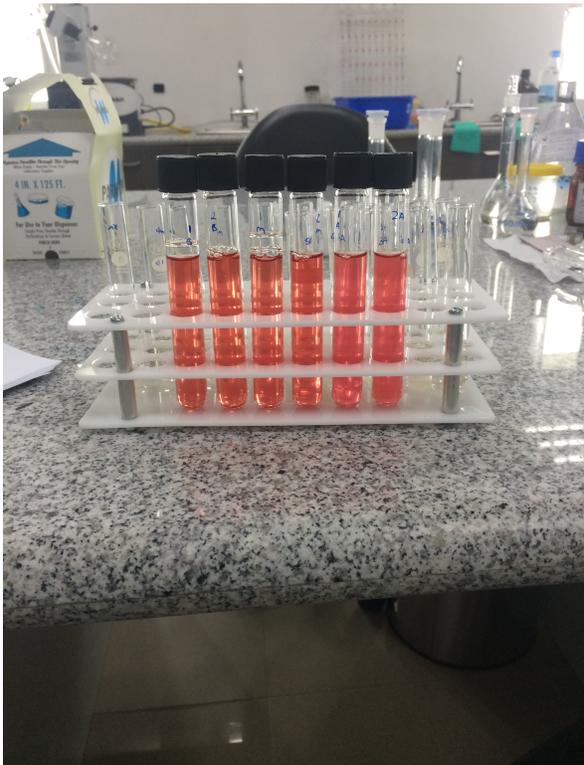
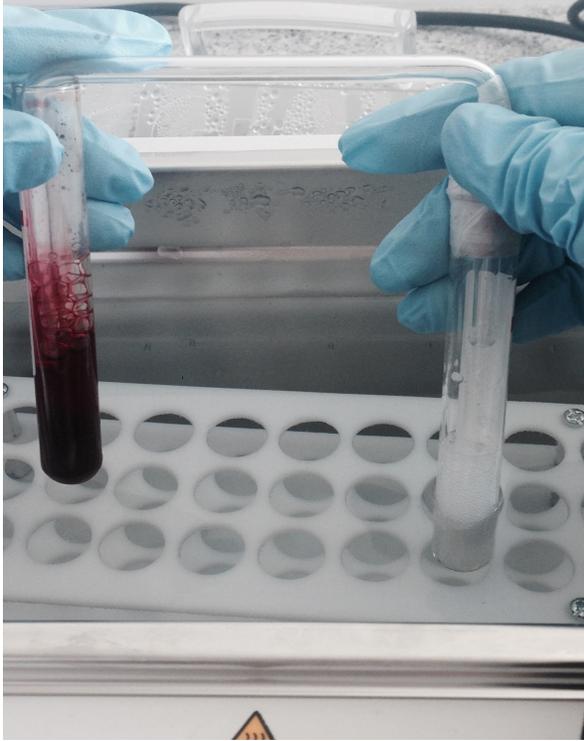
- Valcárcel M. (2002) *La calidad en Laboratorios analíticos*. Editorial Reverté S.A, España (p. 164)

ANEXOS

Anexo 1 Toma de muestras



Anexo 2 Procedimiento



Anexo 3 Registros

 POLICIA NACIONAL DEL ECUADOR LABORATORIO DE TOXICOLOGIA FORENSE	REGISTRO: USO DE EQUIPOS		CODIGO: RUE-ESPE-001
	ESPECTROFOTOMETRO UV/VIS Marca: PerkinElmer Modelo: Lambda 25		Edición: 00
Fecha Aprobación:			

ACTIVIDAD	FECHA	NOMBRE DEL RESPONSABLE	FIRMA
Determinación de Carboxi hemoglobina	23-Abril-2015	Juz Cadavid : Silvia Yumbato : Estalinda Corral	<i>[Signature]</i>
Determinación CBHb (Método 2)	04 Mayo/2015.	Juz Cadavid GRUPO VEHISEBA	<i>[Signature]</i>
PRUEBAS DET. COHbS Wk	06/05/2015	JUZ CADAVID	J. CADAVID
PRUEBA VENTANERO Wk	11/05/2015	JUZ CADAVID	J. CADAVID
PRUEBA DIA VENTANERO DIA	13-05-15	JUZ CADAVID	J. CADAVID
RESUPO DIA VENTANERO DIA	14-05-15	JUZ CADAVID	J. CADAVID
TERCER DIA VENTANERO DIA	15-05-15	JUZ CADAVID	J. CADAVID
LIMITE DET Y CANTIDAD.	16-05-15.	JUZ CADAVID	J. CADAVID
CONTROL DIA Variación COhb.	16-05-15	CATALINA CARILLO.	<i>[Signature]</i>
MEDICION MUESTRAS TESIS	19-05-15	JUZ CADAVID	J. CADAVID
MUESTRAS TESIS	20-05-15	JUZ CADAVID	J. CADAVID
MUESTRAS TESIS	25-05-15	JUZ CADAVID	J. CADAVID

Numero	Nombre	Edad	Lugar de trabajo	Lugar de residencia	Cocina con leña	Vive cerca a ladrilleras	Fuma	Cuantos cigarrillos x dia
1	SEGUNDO CESAR MALVARIO	90	NONE	NONE	✓	-	NO	
2	FERNANDO RAMOS	80	"	"	Aceq	-	NO	
3	AURELIO RIVERA	46	"	"	NO	-	NO	
4	JOSE GONZALEZ BOMBAC	72	"	"	Aceq.	-	NO	
5	JULIO PASTILLA	21	"	NONE	X	-	SI ✓	1 dia.
6	MARIA ALBA	90	NONE	NONE	X/Aceq	-	NO	
7	SEGUNDO GUARDO	74	"	"	NO	-	NO	
8	MIGUEL GALIANO	30	QUITO	NONE	NO	-	NO	
9	CELA CALERO	19	LOND	ABONO	NO	-	NO	
10	ZETA VICARINA (C) (C)	52	NONE	NONE.	gas	-	NO	
11	PAULINA GARIBAY	44	NONE	"	gas	-	NO	
12	TARME SIMBUICA	52	NONE	"	gas	-	NO	
13	VICTOR MORALES	34	NONE	NONE	gas	-	SI ✓	3 semana
14	BLANCA VILLAGAL	34	NONE	NONE	gas	-	NO	
15	PELLO ARIAS	20	NONE	"	gas	-	NO	
16	VICENTE COLLEGAJUS	75	NONE	NONE	gas.	-	SI ✓	
17	OSCAR GUICHAN	25	NONE	NONE	gas.	-	NO	
18	CRISTIAN REYES	28	NONE	NONE	gas	-	NO	
19	OSCAR GUTANOLUISA	32	NONE	"	gas	-	NO	
20	SHARAN FRIAS	21	"	"	gas	-	NO	
22	JULIO CESAR	48	"	"	gas	-	NO	
23								
24	FERNANDO							
25	ANTONIO GUSTO	74	QUINUA	QUITO	X		SI	15 dia.
26	ANITA CASTELL	21	CUMAYTA	CUMAYTA	X		SI	10 dia.
27								
28								
29								
30								

Fecha:

Anexo 4 Reporte espectrofotómetro

Date : 5/14/2015 Time : 12:09:32

Wavelength Program

Date: 5/14/2015 Time: 11:50:40 AM Method: WP1
 Slit: UV/VIS: 1.00 nm
 Analyst:

*VALIDACIÓN
2do DIA*

Sample ID	Cyc	Factor	432.00	420.00	nm
Blanco	1	1.0000	-0.000	-0.000	
1bajo	1	1.0000	0.3659	0.2837	2.02
2bajo	1	1.0000	0.3465	0.2688	2.05
3bajo	1	1.0000	0.4108	0.3187	2.06
4bajo	1	1.0000	0.3818	0.2959	1.99
5bajo	1	1.0000	0.3922	0.3042	2.04
1med	1	1.0000	0.3178	0.3628	26.49
2med	1	1.0000	0.3126	0.3557	26.28
3med	1	1.0000	0.2872	0.3243	25.99
4med	1	1.0000	0.3140	0.3566	26.16
5med	1	1.0000	0.3211	0.3581	24.99
1alto	1	1.0000	0.1987	0.4798	72.58
2alto	1	1.0000	0.2022	0.5033	74.28
3alto	1	1.0000	0.2012	0.5116	75.46
4alto	1	1.0000	0.2033	0.5037	74.02
5alto	1	1.0000	0.2239	0.4959	67.64
m26	1	1.0000	0.4363	0.3406	2.44
m27	1	1.0000	0.4779	0.3783	3.30
m28	1	1.0000	0.4030	0.3168	2.87

muestra

Anexo 5 Libros de registros



Anexo 6 Fichas técnicas

 POLICIA NACIONAL DEL ECUADOR LABORATORIO DE TOXICOLOGIA FORENSE	HOJA TECNICA	Código:	HT-ESPE-001
		Edición:	00
	ESPECTROFOTOMETRO UV/VIS	Fecha Aprobación:	



LOCALIZACION: AREA DE EQUIPOS TOXICOLOGIA MESON No. 2
NOMBRE DEL FABRICANTE: PERKIN ELMER
MARCA: PERKIN ELMER
MODELO: LAMBDA 25
CODIFICACION DEL LABORATORIO: 001
NUMERO DE SERIE: 501S14010726
FECHA DE COMPRA: 11-sept-2013 **PRECIO:** 18.338,00
AÑO DE FABRICACION: 2014
FECHA DE RECEPCION: 16-07-2014 (CUSTODIA)
FECHA PRIMER FUNCIONAMIENTO: 24-07-2014
FECHA DE ENTREGA: 14-07-2014
ESTADO DEL EQUIPO: NUEVO
MANUAL: SI **CÓD.** 001 ESTANTERIA DEL AREA DE EQUIPOS

 <p>POLICIA NACIONAL DEL ECUADOR LABORATORIO DE TOXICOLOGIA FORENSE</p>	HOJA TECNICA	Código:	HT-BAL-006
		Edición:	00
	BALANZA ANALITICA	Fecha Aprobación:	



LOCALIZACION:	AREA DE BALANZAS
NOMBRE DEL FABRICANTE:	THERMO SCIENTIFIC
MARCA:	Ohaus
MODELO:	EX224
CODIFICACION DEL LABORATORIO:	006
NUMERO DE SERIE:	B417528859
FECHA DE COMPRA: 11-sept-2013	PRECIO: \$ 4.102,00
AÑO DE FABRICACION:	2013
FECHA DE RECEPCION:	18-08-2014 (CUSTODIA)
FECHA PRIMER FUNCIONAMIENTO:	20-08-2014
FECHA DE ENTREGA:	20-08-2014
ESTADO DEL EQUIPO:	NUEVO
MANUAL: SI	CÓD. 006 ESTANTERIA DEL AREA DE EQUIPOS

 POLICIA NACIONAL DEL ECUADOR LABORATORIO DE TOXICOLOGIA FORENSE	HOJA TECNICA	Código:	HT-BM-014
		Edición:	00
	BAÑO MARIA	Fecha Aprobación:	



LOCALIZACION:	AREA DE PREPARACION DE MUESTRAS MESON No. 2
NOMBRE DEL FABRICANTE:	GRANTINSTRUMENT
MARCA:	GRANT
CODIFICACION DEL LABORATORIO:	014
NUMERO DE SERIE:	UM1347002
FECHA DE COMPRA: 11-sept-2013	PRECIO: \$ 710,00
AÑO DE FABRICACION:	2013
FECHA DE RECEPCION:	18-08-2014 (CUSTODIA)
FECHA PRIMER FUNCIONAMIENTO:	20-08-2014
FECHA DE ENTREGA:	20-08-2014
ESTADO DEL EQUIPO:	NUEVO
MANUAL:	NO

 POLICIA NACIONAL DEL ECUADOR LABORATORIO DE TOXICOLOGIA FORENSE	HOJA TECNICA	Código:	HT-CBS-019
		Edición:	00
	CABINA DE BIOSEGURIDAD CELL CLASE TIPO A 2	Fecha Aprobación:	



LOCALIZACION:	AREA DE PREPARACION DE MUESTRAS (JUNTO AL MESON No. 1)
NOMBRE DEL FABRICANTE:	
MARCA:	Labconco
CODIFICACION DEL LABORATORIO:	019
NUMERO DE SERIE:	140592133 A
FECHA DE COMPRA: 11-sept-2013	PRECIO: \$ 14.639,00
AÑO DE FABRICACION:	2014
FECHA DE RECEPCION:	18-08-2014 (CUSTODIA)
FECHA PRIMER FUNCIONAMIENTO:	28-10-2014
FECHA DE ENTREGA:	28-10-2014
ESTADO DEL EQUIPO:	NUEVO
MANUAL: SI CD	COD. 0019 ESTANTERIA DEL AREA DE EQUIPOS