

## Validación de un método de cuantificación de carboxihemoglobina y su aplicación en grupos vulnerables de Quito (Ecuador)

VALIDATION OF A METHOD TO DETERMINE LEVELS OF CARBOXYHEMOGLOBIN AND ITS ASSESSMENT ON THE VULNERABLE GROUPS IN QUITO (ECUADOR)

Luz CADAVID MORA<sup>1</sup>, Katty CORAL CARRILLO<sup>2</sup>, Pablo CASTILLEJO PONS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Criminalística, Quito, Ecuador. Correo-e: karimecadavid\_30@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador. Correo-e: katty.coral@uisek.edu

*Correspondencia:* Pablo Castillejo Pons. Universidad Internacional SEK. Quito, Ecuador.  
Correo-e: pablo.castillejo@uisek.edu.ec

### 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. En esta validación se obtuvo un *límite de detección* de 0.79% COHB, *límite de cuantificación* 1.94% COHB y un coeficiente de variación < 10% en todos los niveles, valores aceptables para la cuantificación de carboxihemoglobina.

**Palabras clave:** Carboxihemoglobina, validación, monóxido de carbono.

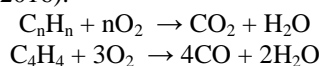
### ABSTRACT

One way to assess human involvement by a pollutant, 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 groups of vulnerable population of Quito metropolitan area.

**Keywords:** Carboxyhemoglobin, validation, carbon monoxide.

### INTRODUCCIÓN

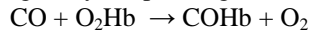
Cuando un hidrocarburo arde con suficiente oxígeno (O<sub>2</sub>), los productos son dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua. Dado que ambas sustancias son componentes normales del aire, generalmente no se consideran como contaminantes. Pero, cuando no hay suficiente oxígeno presente, se forma otro óxido del carbono, el monóxido de carbono (CO) (Macnow y Waltzman, 2016).



El CO es un constituyente natural de la atmósfera y un contaminante cuando está presente por encima de las concentraciones de fondo, La concentración atmosférica global es de 0,1 ppm, debido a las emisiones de CO de los motores de combustión interna. Los niveles más altos de este gas tóxico tienden a ocurrir en las áreas urbanas congestionadas, llegando a alcanzar concentraciones atmosféricas de 50-100 ppm, muy peligrosos para la salud humana (Manahan, 2007).

La carboxihemoglobina (COHb) es una forma alterada de la hemoglobina (Hb), una proteína

presente en los glóbulos rojos que son las células encargadas de transportar el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> de los pulmones a los tejidos corporales. La transformación de oxihemoglobina (O<sub>2</sub>Hb) en COHb, son reacciones reversibles y dependen principalmente de la presión parcial de los gases y del pH sanguíneo.



La COHb es un componente sanguíneo habitual, ya que el CO es un producto del catabolismo de la hemoglobina. En los individuos fumadores esta fracción aumenta, puesto que es uno de los componentes del humo del tabaco (Fuentes et al., 1998).

La afinidad de la hemoglobina por el CO es 218 veces mayor que su afinidad por el oxígeno, y no se modifica. Si existe en el aire índice tóxico de CO y se forma COHb, desciende la cantidad de O<sub>2</sub>Hb. Como consecuencia de la imposibilidad de la COHb de transportar oxígeno, aparece hipoxia. Si la concentración de Hb.Fe.CO es muy alta, la anoxia y los cambios tisulares irreversibles que ésta ocasiona, pueden acarrear la muerte (Miale, 1985).

El nivel de Hb.Fe.CO es un marcador útil para estimar la dosis de CO absorbida por el individuo y por ende, la dosis de exposición. La cantidad de Hb.Fe.CO formada es dependiente de la concentración del contaminante, duración de la exposición al CO, ejercicio, temperatura ambiente, estado de salud y metabolismo del individuo (Ortega García et al., 2007).

En la ciudad de Quito, ya en el año 1999 se reportaron 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 CO (OPS-OMS (s.f., n.d.)).

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, por lo que sus moradores pueden considerarse como poblaciones vulnerables (Coral et al., 2010).

Las poblaciones vulnerables comprenden 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).

Los fumadores son otra población vulnerable ya que la formación de COHb ofrece una dificultad para ceder el oxígeno a tensiones bajas. Si una persona fuma un cigarrillo cada 30 minutos la concentración de COHb 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 Morera y Aguilar Sánchez, 2001).

En este contexto, es importante validar y tomar en cuenta el método analítico para la determinación de la COHb y 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.

La COHb es un componente sanguíneo habitual, ya que el CO es un producto del catabolismo de la hemoglobina. En los individuos fumadores esta fracción aumenta, puesto que es uno de los componentes del humo del tabaco (Fuentes et al., 1998).

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

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 COHb 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.

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” (Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación Swisscontact, 2007), determinándose que las concentraciones de COHb obtenidas con dos métodos diferentes en la población

crónicamente expuesta a emisiones de CO, superan la media esperada en la población.

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

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.

La metodología que fue validada y usada para la medición de COHb 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 COHb, evita que sea reducida, generando dos picos en diferente longitud de onda. Las absorbancias de los pigmentos son medidas a 420 nm y 432 nm, a un pH de 6.85, con absorción de la COHb a 420 nm y de la Hb a 432 nm (Ríos, 2011).

La técnica espectrofotométrica para determinación de COHb, mediante la reducción de 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).

En lo que concierne al área técnica de laboratorio, en el año 2011, 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 COHb (Ríos, 2011).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Toma y preparación de muestras

Se extrajo la sangre venosa a los pacientes en un tubo vacutainer con anticoagulante (heparina de sodio o EDTA). Una vez alcanzaron la temperatura ambiente, en un tubo de ensayo se añadieron 12 mL de solución hemolizante a 100 µL de muestra de sangre. Una vez homogenizados, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se tomaron 100 µL del hemolizado y se diluyeron en 2.43 mL de solución diluyente de COHB. Se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de proceder a la cuantificación.

### Medición de la concentración de COHb en sangre

Las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 y 432 nm, utilizando como blanco la solución diluyente de COHB.

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 monóxido de carbono.

Se usó la siguiente ecuación para calcular la fracción de COHb:

$$\% \text{ COHb} = [1 - (AR \times F_1)] / [AR \times (F_2 - F_1) - F_3 + 1]$$

AR 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  $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_3$  son calculadas de las absorbancias molares de la COHB a 420 y 432 nm.

**Tabla 1.** Niveles de COHb obtenidos por dos analistas diferentes.  
NB: nivel bajo; NM: nivel medio; NA: nivel alto

Analista 1						Analista 2					
1° día 13-05-2015			2° día 14-05-15			3° día 15-05-15			4° día 16-05-2015		
NB	NM	NA	NB	NM	NA	NB	NM	NA	NB	NM	NA
2,1	26,2	73,9	2,0	26,4	72,5	1,9	26,9	71,7	2,1	26,3	71,4
1,9	26,9	74,2	2,0	26,2	74,2	1,7	26,6	71,4	1,8	27,0	75,6
1,9	26,8	72,8	2,0	25,7	75,4	1,9	25,7	76,4	1,9	26,7	75,1
2,6	26,9	68,2	1,9	26,1	74,0	1,7	26,8	72,1	1,9	26,4	76,7
1,8	26,0	71,8	2,0	25,7	67,6	1,8	24,3	73,3	1,9	26,5	72,8
$\bar{x}=2,1$	$\bar{x}=26,6$	$\bar{x}=72,2$	$\bar{x}=2,0$	$\bar{x}=26,1$	$\bar{x}=72,8$	$\bar{x}=1,8$	$\bar{x}=26,1$	$\bar{x}=73,0$	$\bar{x}=1,9$	$\bar{x}=26,6$	$\bar{x}=74,3$

El diseño de validación para la determinación de COHb basado en *A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (Eurachem, 1998), contempló los parámetros de *precisión* (repetibilidad y la reproducibilidad), *veracidad* (comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos), *límite de cuantificación* (la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión) y *límite de detección* (determinación de la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad que puede detectarse confiablemente por el método).

Para medir la precisión se analizaron 3 niveles de concentración de COHb: 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).

Para determinar la veracidad del método se comparó el método validado (reducción con ditionito de sodio) con un segundo método (reducción con sulfihidrato amónico) y se hizo un estudio de prueba F.

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.

### Selección de la muestra poblacional

Completaron el estudio un total de 189 personas, divididos en cuatro grupos: población control (grupo 1), población zona expuesta a emisiones de CO, Sur de Quito (grupo 2), población zona expuesta a emisiones de CO, Centro Histórico (grupo 3), población personas fumadoras (grupo 4).

Grupo 1: 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.

Grupo 2: 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.

Grupo 3: La tercera muestra fue de 80

**Tabla 2.** Nivel bajo de COHb por día.

Valores COHB/día Nivel Bajo			
Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día / 2° analista
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
$\bar{x} = 2,10$	$\bar{x} = 2,03$	$\bar{x} = 1,85$	$\bar{x} = 1,97$
Coeficiente de variación, repetibilidad y reproducibilidad			
<i>CvRepetibilidad</i>	0,09046597	×100=	9,05%
<i>cvReproducibilidad</i>	0,090495863	×100=	9,05%

**Tabla 3.** Nivel medio de COHb por día.

Valores COHB/día Nivel Medio			
Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día / 2° analista
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	25,79	24,3	26,5
$\bar{x} = 26,6$	$\bar{x} = 26,102$	$\bar{x} = 26,1$	$\bar{x} = 26,614$
<i>CvRepetibilidad</i>	0,010880664	0,01	
<i>cvReproducibilidad</i>	0,010883502	1,09	

**Tabla 4.** Nivel alto de COHb por día.

Valores COHB/día Nivel Alto			
Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día / 2° analista
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
$\bar{x} = 72,236$	$\bar{x} = 72,236$	$\bar{x} = 73,032$	$\bar{x} = 74,36$
Coeficiente de variación, repetibilidad y reproducibilidad			
<i>CvRepetibilidad</i>	0,003929899		0,39
<i>cvReproducibilidad</i>	0,003930924		0,39

**Tabla 5.** Veracidad del método de ditionito y el método de formiato de sodio.

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

**Tabla 6.** Límite de detección del método de ditionito de sodio.

<i>Medicion</i>	<i>Valor % COHB</i>
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. estandar	0,164303243
10 S	1,643032427
3 S	0,492909728
Lim Detección	0,79%
Lim Cuantificación	1,94%

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.

Grupo 4: 59 fumadores de una empresa privada, las muestras fueron tomadas directamente en el lugar de trabajo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Precisión:** en el nivel bajo (NB) se obtiene un coeficiente de variación en la repetibilidad (CVR) del 9.05% y un coeficiente de variación para la reproducibilidad (CVr) de 9.05 %, 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).

En el nivel medio (NM) 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).

En el nivel alto (NA) 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).

**Veracidad:** se obtuvieron 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 Orozco y Rodríguez Báez, n.d.) (Tabla 5).

El Límite de Detección obtenido es de 0.79% y el Límite de Cuantificación es de 1.94%. Estos valores pueden ser aceptados ya que la tablas de criterio toxicológico inician sus comparaciones a partir del 2% (Tabla 6).

### Medición del valor % COHb en poblaciones control y vulnerables

Grupo1: 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 (Repetto y Repetto, 2009), 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: 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

**Tabla 7.** Cálculos estadísticos de las mediciones de COHb por el método de ditionito de sodio en las diferentes cohortes.

	<i>Nono</i>	<i>Guamaní</i>	<i>C. Histórico</i>	<i>Fumadores</i>
Media	2,73	2,73	2,59	3,52
Desviación estándar	0,29	0,29	0,51	1,49
Coefficiente de asimetría	0,44	0,44	1,86	2,26
Nivel de confianza (95,0%)	0,11	0,11	0,11	0,38

COHB (Repetto y Repetto, 2009). Los datos son consistentes y homogéneos (Tabla 7).

Grupo 3: 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 y Repetto, 2009). Los datos son consistentes y homogéneos (Tabla 7)

Grupo 4: 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).

## CONCLUSIONES

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

El método ofrece un Límite de detección conveniente para determinaciones en niveles bajos y una buena precisión en niveles altos, lo que 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) corresponden a lo esperado, 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, posiblemente debido a la mejora en la calidad de los combustibles en el Ecuador y a la reducción en las emisiones de CO desde el año 2007 (Coral et al., 2010).

Un nivel bajo de COHb 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 por lo que se refiere al acortamiento potencial de ciertas actividades profesionales recreativas o con alguna exigencia física (Ortega García et al., 2007).

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.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación Swisscontact. (2007). Efectos de la exposición prolongada al monóxido de carbono ambiental en la población urbana de Cochabamba.
- Coral, K., Villalba, F., & Echeverría, H. (2010). *Plan Nacional de calidad del aire*.
- Eurachem. (1998). *Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Londres.
- Fuentes X, Castiñeiras M J, & Queraltó J M. (1998). *Biología clínica y patología molecular II*. Editorial Reverté. España.
- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. Editorial Reverté. España.
- Miale, J. B. (1985). *Hematología: medicina de laboratorio*. Editorial Reverté. España.
- Miranda, J. J. (2005). *Gestión de Proyectos*. Colombia: Guadalupe Ltda.
- OPS-OMS (s.f). (n.d.). Calidad del aire en la ciudad de Quito [www.bvsde.ops-oms.org](http://www.bvsde.ops-oms.org).
- Ortega García, J. A., Ferrís i Tortajada, J., & López Andreu, J. A. (2007). Paediatric environmental health speciality units in Europe: integrating a missing element into medical care. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210 (5), 527–9.
- Ríos, D. (2011). Validación del método para determinación de carboxihemoglobina en sangre total por la técnica espectrofotométrica con reducción con ditionito de sodio. Universidad Nacional de Colombia.
- Torres Morera, L. M., & Aguilar Sánchez, J. L. (2001). *Tratado de anestesia y reanimación*. Arán Ediciones.