

*Universidad Nacional de Ingeniería
Facultad de Ciencias
Escuela Profesional de Química*



*Tesis para optar el Título Profesional de
Licenciada en Química*

*“Determinación Espectrofotométrica de Carboxihemoglobina y
su Análisis en Fumadores de la Ciudad de Lima”*

*Presentado por: Mercedes Lucía Díaz Arias
Lima - Perú
1999*

ÍNDICE

	Páginas
PRESENTACIÓN.....	1-2
OBJETIVOS.....	3
ANTECEDENTES.....	4
<u>1. FUNDAMENTO TEÓRICO</u>	
<u>1.1 HEMOGLOBINA Y MIOGLOBINA</u>	
1.1.1 <i>Porfirinas y Metaloporfirinas</i>	6-8
1.1.2 <i>Hemoproteínas</i>	9-11
1.1.3 <i>Estructura Molecular</i>	12-13
<u>1.2 TRANSPORTE DE OXÍGENO</u>	
1.2.1 <i>Termodinámica y Cinética de Oxigenación</i>	14-17
1.2.2 <i>Mecanismo de Oxigenación</i>	17-18
1.2.3 <i>Estructuras del Mecanismo de Oxigenación</i>	19-21
1.2.4 <i>Propiedades Espectroscópicas de la Hemoglobina al combinarse con gases:</i>	21-23
<u>1.3 EFECTO DEL MONÓXIDO DE CARBONO EN LA HEMOGLOBINA</u>	
1.3.1 <i>Contaminante biológico</i>	24-27
1.3.2 <i>Mecanismo de Carboxilación</i>	28-29
1.3.3 <i>Concentraciones de la Carboxihemoglobina por el consumo de tabaco</i>	29-33
1.3.4 <i>Métodos de Evaluación del CO en Sangre</i>	33-34
<u>1.4 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA POR MONÓXIDO DE CARBONO</u>	
1.4.1 <i>Propiedades Físicoquímicas</i>	35
1.4.2 <i>Límites Permisibles de la concentración de CO en el Aire</i>	36
1.4.3 <i>Métodos de Evaluación del CO en el Aire</i>	37
<u>2. PARTE EXPERIMENTAL</u>	
<u>2.1 Método Espectrofotométrico de medición del CO sanguíneo como Carboxihemoglobina (HbCO)</u>	40
2.1.1 <i>Preparación de la Muestra de Sangre</i>	
2.1.1.1 <i>Método inicial</i>	41-42
2.1.1.2 <i>Método modificado</i>	42

<i>2.1.2 Procedimiento Experimental del Método Espectrofotométrico</i>	
<i>2.1.2.1 Oxihemoglobina Saturada (HbO₂)</i>	43
<i>2.1.2.2 Carboxihemoglobina Saturada (HbCO)</i>	44
<i>2.1.2.3 Hemoglobina (Hb)</i>	44
Cálculo del porcentaje de HbCO en Muestras de Sangre	45-47
<u>2.2 Pruebas Cualitativas de Identificación de la Carboxihemoglobina (HbCO)</u>	48-49
<i>2.2.1 Prueba de Desoxigenación</i>	50
<i>2.2.2 Prueba Espectrofotométrica</i>	50
<i>2.2.3 Prueba del Acido Tánico</i>	51
<i>2.2.4 Prueba del Ácido Pirogálico - Ácido Tánico “Método de Sayers-Yant”</i>	52
<u>2.3 Determinación de la Hemoglobina “Método de la Metacianohemoglobina”</u>	53-54
<i>2.3.1 Procedimiento de Calibración del Método</i>	55
<i>2.3.2 Procedimiento para la Determinación de Hemoglobina Total en Sangre</i>	55
<u>2.4 Evaluación del Nivel de HbCO en no fumadores y fumadores de la Ciudad de Lima</u>	56
<i>2.4.1 Nivel de Carboxihemoglobina en no fumadores</i>	56
<i>2.4.2 Nivel de Carboxihemoglobina en fumadores</i>	57
<i>2.4.3 Encuesta realizada a los fumadores</i>	58
<u>2.5 Determinación por Tubos Colorimétricos de la concentración de CO (ppm)</u>	59-60
<i>2.5.1. Medición de CO en un ambiente interior expuesto al humo de cigarrillos</i>	61
<i>2.5.1.1. Blanco de reactivos</i>	61
<i>2.5.1.2. Toma de muestra en el ambiente contaminado con CO</i>	61
<u>3. DATOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</u>	
<u>3.1 Método Espectrofotométrico de medición del CO sanguíneo como Carboxihemoglobina (HbCO)</u>	63
<i>3.1.1 Estudio de los Espectros de Absorción</i>	63-97
<i>3.1.2 Cálculo de los Coeficientes de Extinción Molar Promedio de los derivados de la Hemoglobina</i>	98-102
<i>3.1.3 Curvas de Saturación de la Hemoglobina</i>	103-105

<u>3.2 Pruebas Cualitativas de Identificación de la Carboxihemoglobina (HbCO)</u>	106-108
3.3 Determinación de la Hemoglobina “Método de la Metacianohemoglobina”	109
3.3.1 <i>Estudio del Espectro de Absorción de la Metacianohemoglobina</i>	109-111
3.3.2 <i>Cálculo del Coeficiente de Extinción Molar Promedio de la Metacianohemoglobina</i>	112-113
3.3.3 <i>Dependencia experimental de la altura óptica (h) de la HbCO con la cantidad de Hb(g/100mL)</i>	114-116
<u>Método Espectrofotométrico Modificado</u>	116-117
<u>3.4 Evaluación del Nivel de HbCO en no fumadores y fumadores de la Ciudad de Lima según la Estadística realizada por CEDRO (1995)</u>	118
3.4.1 <i>Muestra Poblacional escogida de la Ciudad de Lima para la aplicación del Método Espectrofotométrico modificado</i>	118-119
3.4.2 <i>Nivel de Carboxihemoglobina en No Fumadores de la Ciudad de Lima</i>	120-121
3.4.3 <i>Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de la Ciudad de Lima</i>	122-129
<u>3.5 Determinación por Tubos Colorimétricos de la concentración de CO (ppm)</u>	130
3.5.1 <i>Medición de CO en un ambiente interior expuesto al humo de cigarrillos</i>	130-133
<u>Resumen de Resultados Experimentales</u>	134
<u>Sugerencias</u>	134-135
4. CONCLUSIONES	136-137
<u>5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	138-141
6. ANEXOS	
Anexo N°1: Equipo de Generación de Oxígeno.....	143-144
Anexo N°2: Equipo de Generación de Monóxido de Carbono.....	145-146
Anexo N°3: Equipo de Extracción de la Sangre VENOJECT®II.....	147
Anexo N°4: Disolución de sangre preparada a pH = 12.3.....	148
Anexo N°5: Espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 21-D.....	149

<u>Anexo N°6: Sistema de Detección Colorimétrica SENSIDYNE.....</u>	150-151
<u>AnexoN°7: Tubo de Detección N° 1L de 2,5 a 2000 CO (ppm).....</u>	152-153
<u>Anexo N°8: Monografía de Investigación N°15 “Epidemiología de drogas en la población urbana peruana – 1995” CEDRO.....</u>	154-158
<u>Anexo N°9: Medición directa de <i>CO</i> del humo de cigarrillos.....</u>	159-163
<u>Anexo N°10: Parámetros Estadísticos usados.....</u>	164

PRESENTACIÓN

Este trabajo de investigación para mi **Tesis de Licenciatura en Química** fue realizado bajo la tutoría de la Lic. Quím. Gina Chiarella Mansilla dentro del grupo de Química Inorgánica de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Este trabajo surge de la inquietud de estudiar los espectros electrónicos de los enlaces metal-ligando en sistemas biológicos y se ha escogido el sistema carboxihemoglobina por las tendencias actuales de abordar temas de contaminación ambiental, que son tratados en su base conceptual y mecanística por la **BIOINORGÁNICA** (rama multidisciplinaria de la Química que no cuenta con más de 30 años de existencia).

La importancia de la molécula de hemoglobina se manifiesta por ser un excelente ejemplo de un compuesto de coordinación que participa del proceso que es necesario para sustentar la vida del hombre, en ella el metal hierro (*II*) se enlaza a 4 átomos de nitrógeno del anillo porfirínico, en la quinta coordinación se enlaza con un nitrógeno proveniente del aminoácido histidina y puede enlazar a un ligando más como la molécula de oxígeno, completando la coordinación 6 característica del hierro. Dicho sistema transportador de oxígeno puede ser alterado muy fácilmente, enlazando otros ligandos con características químicas similares como son el monóxido de carbono, el óxido nítrico y el sulfuro de hidrógeno, los cuales tienen efectos nocivos en la salud.

En este trabajo se hace uso de consideraciones estructurales que influyen en la estabilidad del enlace metal-ligando para optimizar el Método Espectrofotométrico en la determinación del monóxido de carbono de la sangre y se busca como aplicación específica determinar niveles de carboxihemoglobina en una muestra poblacional de no fumadores y fumadores de la Ciudad de Lima según la estadística de 1995 efectuada por la Institución Nacional CEDRO (*Centro de Información y Educación para la prevención del abuso de drogas*). El nivel de carboxihemoglobina hallado está relacionado con la cantidad de cigarrillos que se fuma al día y se determina teóricamente la concentración promedio de monóxido de carbono al que se ha estado expuesto en equilibrio, teniendo en cuenta ciertas consideraciones como parte del desarrollo del método analítico.

En la parte experimental se propone una modificación experimental al método espectrofotométrico, estudiándose cuantitativamente los espectros visibles de los

derivados de la hemoglobina y relacionando la cantidad de hemoglobina de la sangre en g/100mL con respecto a la saturación de las muestras con monóxido de carbono. Se emplea el Método de la Metacianohemoglobina para calcular la cantidad de hemoglobina en las muestras de sangre y la saturación de las mismas muestras se realiza usando el Método Espectrofotométrico. Dicha relación permite escoger un rango de aplicación donde se cumple la linealidad y presentar el Método de la Metacianohemoglobina, para modificar experimentalmente el Método Espectrofotométrico. Para aplicar el Método Espectrofotométrico modificado y explicar su alcance se escoge una muestra poblacional de no fumadores y fumadores de Lima de acuerdo a la estadística vigente.

Con la intención de tener una relación referencial entre los niveles de carboxihemoglobina y el monóxido de carbono ambiental se utiliza el Método de los Tubos Colorimétricos, para lo cual se toma directamente muestras de humo de cigarrillos que se desprenden al aire, humo que uno inspira durante el acto de fumar en condiciones extremas y se evalúa el aire de un ambiente interior expuesto a una cantidad de cigarrillos, que nos da una concentración promedio de monóxido de carbono al que personas no fumadoras están expuestas y que aumenta su nivel de carboxihemoglobina.

Así este trabajo enfoca aspectos comunes a la Química Bioinorgánica, Química Instrumental, Química Ambiental y Toxicología.

La primera parte de este trabajo de investigación fue presentado en el Congreso Peruano de Química en el año de 1995 abarcando el efecto de ligandos carbonilo CO , nitrosilo NO e hidrógeno sulfurado H_2S , dando los espectros visibles característicos para la aplicación del método espectrofotométrico. Estos datos se encuentran en los trabajos de investigación de Proyectos de Tesis^(12,13) realizados en el pregrado de mi carrera de Química.

OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación tiene como principales objetivos los siguientes:

1. Verificar el Método Espectrofotométrico en la determinación de Monóxido de Carbono en Sangre a partir de la variación de las longitudes de onda de los derivados de la Hemoglobina y proponer una modificación experimental que fije un rango de aplicación del método propuesto.
2. Evaluar cuantitativamente el nivel de Carboxihemoglobina en no fumadores y en fumadores de la Ciudad de Lima de acuerdo a la estadística vigente.
3. Proponer variables que puedan influir en el nivel de Carboxihemoglobina como consecuencia del hábito de fumar.

ANTECEDENTES

La contaminación ambiental es uno de los problemas que afrontan las grandes ciudades del mundo como consecuencia de su densa población y de su desarrollo. La calidad del aire se determina en función de los contaminantes atmosféricos como SO_2 , CO , *partículas suspendidas totales*, *oxidantes fotoquímicos*, *hidrocarburos* y *óxidos de nitrógeno*, cuyas normas representan la mejor información científica sobre su concentración en el aire y sus efectos sobre el hombre y su medio ambiente. Estas normas de calidad del aire pueden tener aplicación internacional, nacional y local, actualmente cada país ha asumido estas normas o están en proceso de evaluación como es el caso de nuestro país mediante el Código del Medio Ambiente.

El monóxido de carbono es uno de los principales polutantes del aire y los efectos tóxicos de dicho gas fueron ya señalados desde el siglo pasado, a principios de este siglo se demuestra la toxicidad de este gas en relación con las labores ocupacionales, demostrándose la combinación del CO con la hemoglobina. A partir de este momento se han realizado diversos trabajos de investigación sobre el nivel de carboxihemoglobina en grupos poblacionales de Inglaterra, Estados Unidos^(2,29), México⁽²⁸⁾ y actualmente en países como Brasil y Chile según información recibida en CEPIS (*Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente*) con sede en Lima, Perú. Dichos estudios se desarrollan basándose en diversos métodos estandarizados, entre los cuales se emplea más comúnmente el método de infrarrojo no dispersivo por su mayor sensibilidad y menos frecuente el espectrofotométrico, contribuyen con resultados experimentales que reflejan el grado de contaminación por CO en personas afectadas por el tráfico de vehículos de las ciudades y por el hábito de fumar.

A nivel del Perú tenemos trabajos realizados sobre la determinación de CO en sangre que no involucran estadísticas poblacionales, sólo comparación de métodos analíticos y evaluaciones recientes sobre impacto ambiental⁽²⁷⁾.

El presente estudio se orienta a reportar un nivel de carboxihemoglobina en no fumadores y fumadores de Lima usando el Método Espectrofotométrico modificado, constituyendo uno de los primeros trabajos que reflejan la relación de la contaminación de CO con el hábito de fumar, dando variables que pueden aumentar o disminuir dicho nivel, además se mide la concentración de CO en un ambiente interior sometido al humo de una cantidad de cigarrillos para relacionarlo con el nivel de carboxihemoglobina que alcanzaría un fumador pasivo.

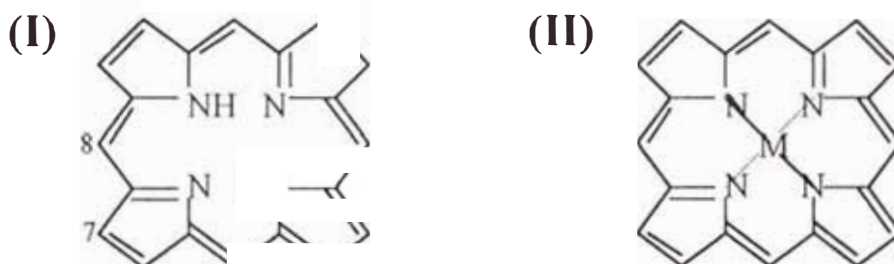
1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 HEMOGLOBINA Y MIOGLOBINA:

1.1.1 Porfirinas y Metaloporfirinas:

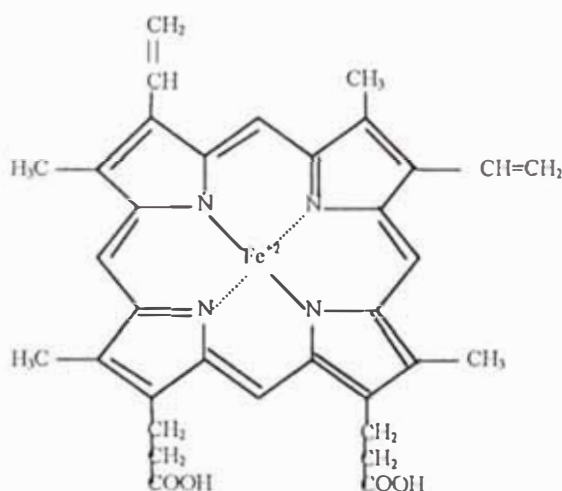
Las metaloporfirinas constituyen un grupo de complejos metálicos que se presentan en los sistemas biológicos y tienen como estructura básica a la *porfina* (Figura N°1). Los derivados de la porfina, sustituidos del 1 a 8 reciben el nombre de *porfirinas*. Las porfirinas son sistemas macrocíclicos tetrapirrólicos con dobles enlaces conjugados, poseen capacidad electrodonante σ y electroatrayente π , en los complejos presentan orbitales moleculares deslocalizados en el plano. Tiene capacidad para aceptar dos protones, formando un diácido 2^+ o donar dos protones formando un anión 2^- . Cuando se incorpora un ión metálico por desplazamiento de ambos hidrógenos de los grupos *NH* se les llama *metaloporfirinas* (Figura N°1).

Figura N°1: Porfina (I) y Metaloporfirina (II)⁽³⁾



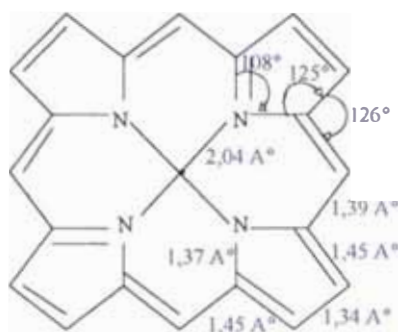
Las porfirinas pueden generar complejos cuadrados planos, piramidales (coordinación 5) u octaédricos (coordinación 6). Una de las más frecuentes en la naturaleza es la **protoporfirina IX** que se encuentra en la hemoglobina, mioglobina y peroxidasa^(3,8) (Figura N°2).

Figura N°2: Fe-Protoporfirina IX (Estructura del Grupo Hemo)⁽³⁾



La serie más completa de parámetros estructurales para el esqueleto de la porfina es la suministrada por Fleischer (*Figura N°3*).

Figura N°3: Parámetros estructurales de la porfina⁽²⁵⁾



El radio de la cavidad es de aproximadamente 2 Å, lo que indica que en ella pueden colocarse metales de la primera serie de transición como *Ni(II)* (1,93 Å) hasta *Fe(II)* con espín alto (2,1 Å) a pesar de que el sistema porfirínico es muy rígido por la deslocalización de los electrones π en los anillos pirrólicos.

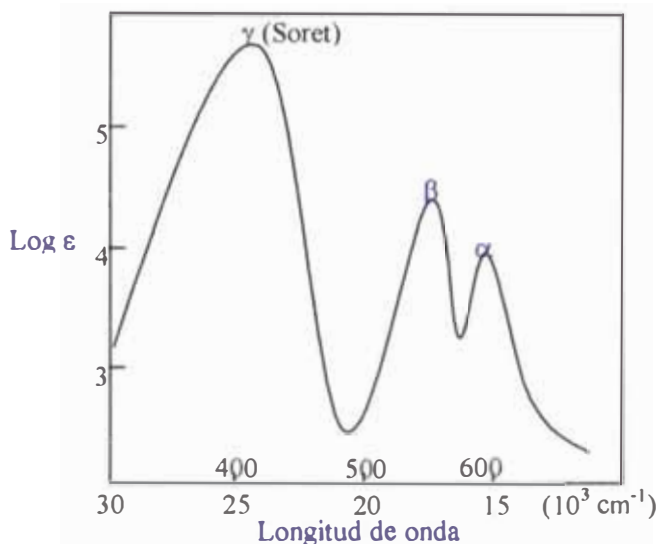
Si el metal es muy pequeño, el anillo se retrae un poco para que los átomos de nitrógeno se acerquen al metal, si el metal es muy grande no entra en la cavidad y se sitúa por encima del anillo. El orden de estabilidad de los complejos de porfirina con iones metálicos 2^+ , se establece por la serie de Irving-Williams⁽⁹⁾, considerando que el anillo es un ligando cuadrado plano: *Ni(II)* > *Cu(II)* > *Co(II)* > *Fe(II)* > *Zn(II)*.

En cuanto a la cinética de formación de las metaloporfirinas el orden es el siguiente: *Cu(II)* > *Co(II)* > *Fe(II)* > *Ni(II)*.

Estudiando estas series notamos que el *Co(II)* se ve favorecido en cuanto a la elección frente al *Fe(II)*, no obstante ya que el *Fe(II)* es más abundante en la naturaleza, se encuentra presente en mayor proporción en estos compuestos⁽⁸⁾. Estos ligandos macrocíclicos fuerzan configuraciones de bajo espín que pueden transformar al centro metálico en un sistema con capacidad donadora π ⁽⁵⁾.

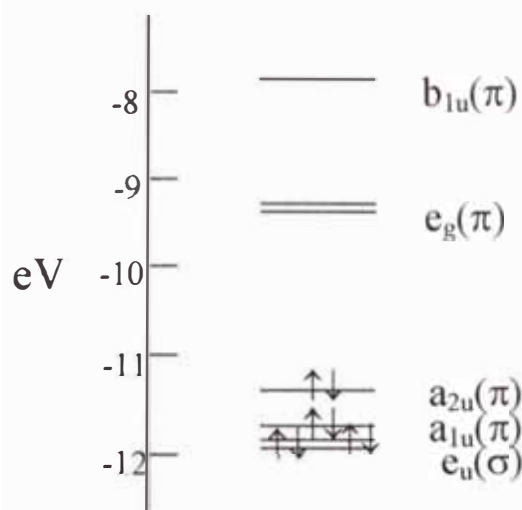
El anillo de porfirina, plano, estable (no está prácticamente sometido a tensiones) y de simetría D_{4h} , posee un sistema de electrones π ampliamente deslocalizado. En consecuencia, las bandas espectrales que aparecen en la región visible se deben a ciertas transiciones π^* (vacante) \leftarrow π (ocupado). Los espectros ópticos de las metaloporfirinas se caracterizan, en general, por una serie de tres bandas, llamadas α , β y γ , que aparecen, respectivamente, de mayores a menores longitudes de onda (*Figura N°4*). La banda γ es con frecuencia denominada **banda de Soret**.

Figura N°4: Espectro de absorción de una porfirina y de una metaloporfirina⁽²⁵⁾



En el sistema π de la porfirina existen muchos orbitales π ocupados; en una simetría D_{4h} los dos orbitales ocupados más altos son a_{1u} y a_{2u} , siendo el nivel vacío más bajo un e_g degenerado (Figura N°5). Los dos estados excitados que proceden de las transiciones $e_g \leftarrow a_{1u}$ y $e_g \leftarrow a_{2u}$ son de simetría E_u y están casi degenerados. A causa de una interacción de configuración se originan dos estados separados, de los que el de energía más alta representa la banda γ , y el de energía más baja, la banda ($\alpha + \beta$). Las bandas ($\alpha + \beta$) se consideran niveles vibracionales de la transición monoeléctronica. Se basa esto en un modelo iónico, en el que el metal se considera como una carga eléctrica. Existe sin embargo, una determinada deslocalización electrónica en torno al metal, pudiendo ocurrir ciertas transiciones de transferencia de carga en las que intervengan orbitales del catión. Estos efectos pueden complicar el espectro óptico en ciertas circunstancias⁽²⁵⁾.

Figura N°5: Parte del diagrama de niveles de energía de una porfirina⁽²⁵⁾



1.1.2 Hemoproteínas:

Las hemoproteínas son compuestos que contienen Fe -porfirina como grupos prostéticos (*porción diferente a los aminoácidos que se halla en una proteína conjugada unida a otros restos o grupos no proteicos*⁽³⁾). Entre los compuestos más importantes de este tipo encontramos la hemoglobina, la mioglobina y los citocromos así como algunos sistemas enzimáticos tales como la catalasa y las peroxidasas^(3,25).

El grupo hemo se forma por la inserción de un Fe (II) en el ambiente de coordinación cuadrada plana proporcionado por los cuatro nitrógenos equivalentes de la protoporfirina IX (*Figura N°2*). La unidad hemo tiene un equilibrio de cargas, pero si el hierro se oxida a Fe (III) , la especie resultante "*hemina*" transporta una carga positiva y debe asociarse a un anión que equilibre la carga. En el estado de espín bajo, tanto el Fe (II) como el Fe (III) suelen situarse dentro de la cavidad de coordinación, pero el Fe (II) y Fe (III) de espín elevado están desplazados fuera de la cavidad hacia una cara del plano del ligando; a este desplazamiento le acompaña una distorsión de la porfirina fuera del plano. Estos cambios estructurales se deben a los mayores radios de los iones con espín alto en relación con los de bajo espín. La tetracoordinación proporcionada por el anillo de porfirina no es suficiente para satisfacer los requisitos de coordinación del Fe (II) , y éste tiene una fuerte tendencia a aumentar su número de coordinación y lograr esto mediante la coordinación con oxígeno, por ello los complejos de porfirina "desnudos" son muy reactivos con el oxígeno y en presencia de agua producen dímeros de Fe (III) con puentes oxo.

Las hemoproteínas consisten en una proteína ligada a una o más unidades hemo por medio de fuerzas físicas como fuerzas de intercambio, enlace hidrofóbico o puentes de hidrógeno, así como enlaces covalentes a través de la periferia del anillo. La proteína normalmente proporciona uno o dos grupos coordinantes para las posiciones de coordinación axial del hierro. Las funciones de coordinación frecuentes son el nitrógeno del imidazol de la histidina, los grupos carboxilatos de los ácidos aspártico y glutámico, el grupo fenóxido de la tirosina y las funciones sulfuro de la metionina y cisteína. La diversidad de estructuras de las proteínas, los modos de unión disponibles y la variedad de diferentes estados de oxidación y de espín del hierro proporcionan amplios sistemas⁽⁵⁾.

Las propiedades de las hemoproteínas están relacionadas con el estado electrónico del átomo de hierro. El momento magnético de las sustancias se determina midiendo su susceptibilidad magnética.

Los iones de *Fe (II)* y *Fe (III)* son, respectivamente, sistemas d^6 y d^5 . En un campo octaédrico o tetragonal el *Fe (II)* puede estar en estado de bajo espín (espín total $S = 0$, diamagnético) o de espín elevado ($S = 2$, paramagnético), en caso de bajo espín es de esperar un momento magnético $\mu_{ef} = 0$ MB (Magnetones de Bohr) y $\mu_{ef} = 4,90$ MB (solo la contribución del espín) para el caso de espín elevado. La hemoglobina tiene un valor de $\mu_{ef} = 5,44$ MB; en general, considerando los momentos magnéticos de complejos de *Fe (II)* octaédricos de alto espín tienen 5,4-5,8 MB. La oxihemoglobina y la carboxihemoglobina tienen un valor de $\mu_{ef} = 0$ MB.

Para los derivados de *Fe (III)-porfirina* un compuesto de espín elevado tiene un valor ideal de $\mu_{ef} = \sqrt{35} = 5,92$ MB ($S = 5/2$), y uno de espín bajo, $\mu_{ef} = \sqrt{3} = 1,73$ MB ($S = 1/2$). Aquellos complejos que tienen ligandos débilmente coordinados en la sexta posición, tales como F^- o H_2O , se encuentran generalmente en estado de espín elevado (Tabla N°1).

Tabla N°1: Propiedades magnéticas de hemoproteínas⁽²⁵⁾

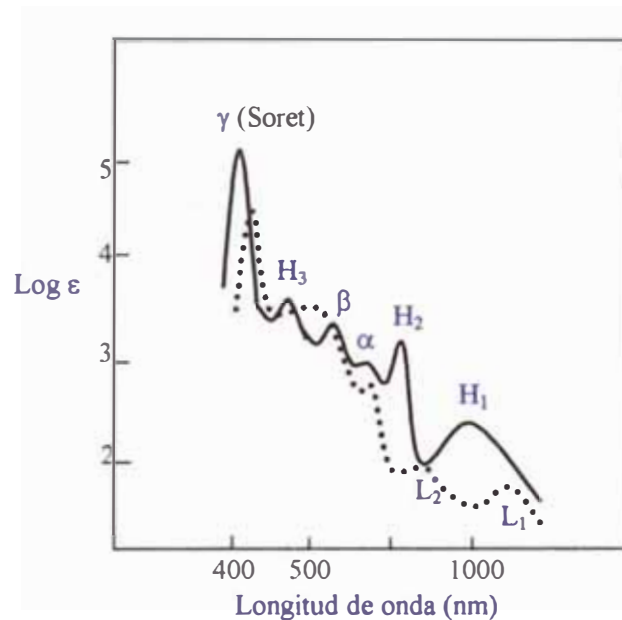
Compuesto	μ_{ef} (en MB a 25°C)
Fe (II) hemoglobina	5,44
Fe (II) hemoglobina- O_2	0
Fe (II) hemoglobina-CO	0
Fe (III) hemoglobina- F^-	5,76
Fe (III) hemoglobina- H_2O	5,65
Fe (III) hemoglobina- AcO^-	5,44
Fe (III) hemoglobina- OH^-	4,66
Fe (III) hemoglobina- NH_3	2,93
Fe (III) hemoglobina-imidazol	2,87
Fe (III) hemoglobina- CN^-	2,5
Fe (III) hemoglobina- N_3^-	2,35
Fe (III) mioglobina- F^-	5,77
Fe (III) mioglobina- H_2O	5,73
Fe (III) mioglobina- OH^-	5,04
Fe (III) mioglobina- N_3^-	3,30
Fe (III) mioglobina- CN^-	1,96

El espectro electrónico de una hemoproteína variará con su estado electrónico. La Figura N°6 muestra los espectros de hemoproteínas de *Fe(III)*, una de espín elevado, la *metamioglobina- H_2O [Fe (III)]* y otra de espín bajo, la *metamioglobina- CN [Fe (III)]*. Se observa que los espectros son más complejos que los de metaloporfirinas típicas con

Fe (II). Se aprecian las bandas típicas α , β y γ , además en los complejos de espín elevado existen tres nuevas bandas H_1 , H_2 y H_3 , y dos en los de espín bajo, L_1 y L_2 (L_2 se observa raramente). H_2 y H_3 se han asignado a la mezcla de una transferencia de carga desde $b_{1u} (\pi) \rightarrow d_{yz}, d_{zx}$ (*Figura N°6*) y una transición $\pi \rightarrow \pi$ en el anillo de porfirina, que da lugar a las bandas α y β . En un complejo de bajo espín, $d_{yz} d_{zx}$ se encuentran probablemente ocupados por completo, imposibilitando la transferencia de carga. Las otras bandas adicionales (L_1 , L_2 y H_1) se consideran también del tipo de transferencia de carga ($L_1, H_1: b_{1u} (\pi) \rightarrow d_{xy}$; $L_2: b_{1u} (\pi) \rightarrow dz^2$)⁽²⁵⁾.

Figura N°6: Espectro de absorción Metamioglobina- H_2O y Metamioglobina CN^- ⁽²⁵⁾

.....

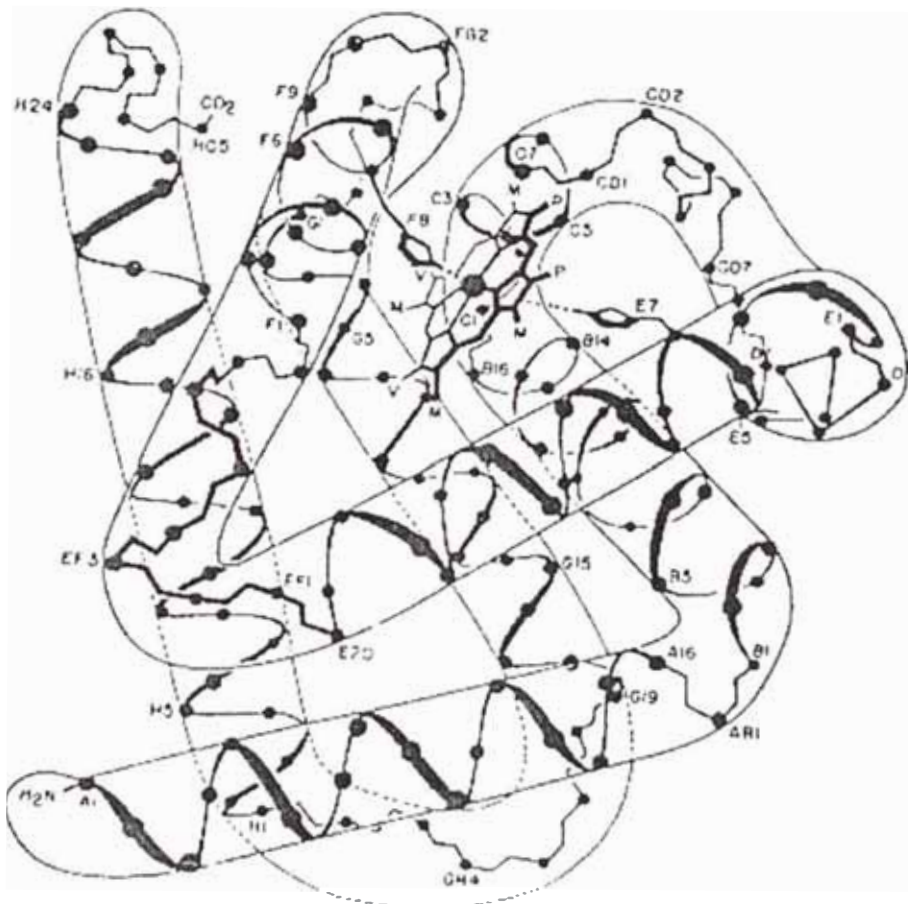


1.1.3 Estructura Molecular:

La **Mioglobina** (*Figura N°7*) es una proteína que está formada por una sola cadena polipeptídica (globina) y un grupo hierro-protoporfirina IX (Hemo) y posee una masa molecular del orden de 17800⁽³⁾.

La **Hemoglobina** consta de una estructura cuaternaria de cuatro unidades de mioglobina, cada una de ellas con un grupo de hierro-propoporfirina IX, con una masa molecular de 64500⁽³⁾. La secuencia de aminoácidos es la misma en dos de las cuatro unidades de proteína y se designan como cadenas α . Las otras dos restantes se llaman cadenas β y son similares, pero no exactamente iguales que las α . Las porciones específicas de los polipéptidos se designan con una o dos letras. Los segmentos correspondientes a las letras A,B,C,D,E,F,G y H tienen estructuras secundarias α -helicoidales; las secciones restantes son grupos terminales, codos o segmentos no helicoidales⁽²⁵⁾.

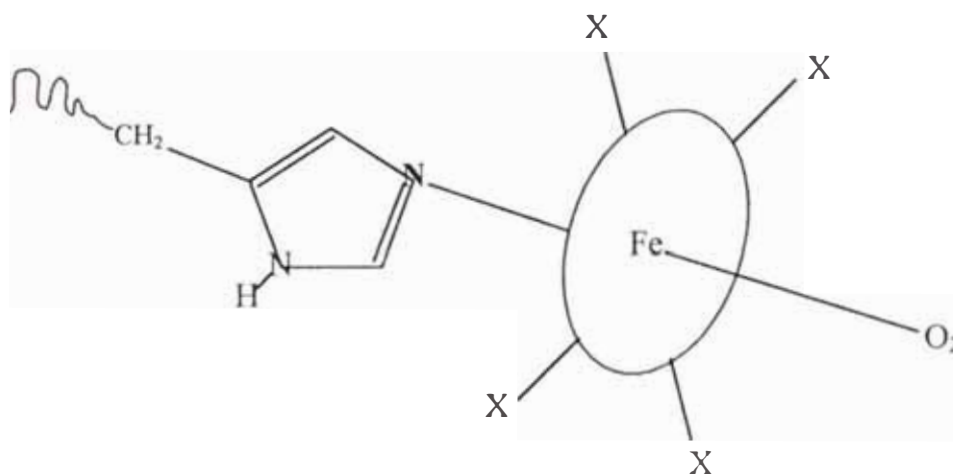
Figura N°7: Estructura de la Mioglobina del esperma de ballena determinada por cristalografía de rayos X⁽²⁵⁾



En la mioglobina y en la hemoglobina el hierro está presente como $Fe(II)$ de espín alto y presenta un índice de coordinación cinco, unido a los cuatro nitrógenos porfirínicos y un quinto átomo, también de nitrógeno, proveniente de un grupo imidazol de un resto de histidina. La sexta posición de coordinación está inicialmente desocupada y en ella puede ubicarse el oxígeno (*Figura N°8*).

El grupo hemo se encuentra encajado en la oquedad superior de la proteína globular, siendo su única conexión importante con la proteína la establecida por enlace coordinado entre el hierro y el átomo de nitrógeno imidazólico de la histidina en la posición proximal. El otro grupo histidina en la posición distal se encuentra demasiado lejos como para su unión directa al átomo metálico, pero está dirigido hacia el centro del grupo hemo pudiendo desempeñar un cierto papel antes de la unión con oxígeno. El grupo hemo, de naturaleza muy similar a un hidrocarburo aromático es mantenido también en su posición por las fuerzas de Van der Waals que sobre él ejercen los restos hidrófobos de los aminoácidos que le rodean⁽³⁾ (*en la Figura N°8 como X*).

Figura N°8: Detalle de la unión del $Fe(II)$ del grupo hemo a la cadena de globina (Oxihemoglobina)⁽³⁾



1.2 TRANSPORTE DE OXÍGENO:

1.2.1 Termodinámica y Cinética de Oxigenación:

Existen varios sistemas transportadores de oxígeno en los organismos vivos, sin embargo vamos a centrar nuestra atención en dos de ellos, el sistema transportador de oxígeno en sangre (*hemoglobina*) y en el músculo (*mioglobina*).

El oxígeno inicialmente es tomado del medio ambiente, en los animales superiores a través de las vías respiratorias, es llevado hasta los pulmones, donde ocurre el proceso conocido como la hematosis, que consiste en un intercambio de gases de la molécula de hemoglobina con el medio ambiente, ésta toma el O_2 y libera el CO_2 generado en los músculos, luego el oxígeno es transportado por esta molécula a través del torrente sanguíneo hasta el músculo, donde es tomado por la mioglobina (que posee una mayor afinidad por el oxígeno que la hemoglobina), para ser utilizado en los diferentes procesos celulares⁽⁸⁾. La hemoglobina tiene todavía una función adicional cual es la de llevar el CO_2 hacia los pulmones; en este transporte parecen participar algunas cadenas laterales de residuos de aminoácidos, no estando los grupos hemo directamente involucrados⁽³⁾.

La constante de equilibrio para la interacción mioglobina Mb/O_2 es la siguiente⁽³⁾.

$$K_{Mb} = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]}$$

Si $[Mb] + [MbO_2]$ es una cantidad que permanece constante, entonces la concentración de oxígeno es la que varía. En la formación de la oxihemoglobina la constante de equilibrio es⁽³⁾:

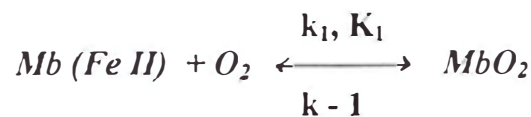
$$K_{Hb} = \frac{[HbO_2]}{[Hb][O_2]^{2,8}}$$

El exponente 2,8 en esta ecuación se debe a que una molécula de hemoglobina puede aceptar 4 átomos de O_2 y el enlace en los cuatro casos no es independiente, se observa en la práctica que al unirse algunas moléculas de oxígeno al anillo porfirínico se favorece la adición de oxígeno en las otras posiciones disponibles, mientras que si únicamente un oxígeno está ligado la tendencia a la disociación es mayor, deduciéndose de ello que a bajas concentraciones de oxígeno la hemoglobina tenderá a disociarse

(perder oxígeno) mientras que a altas concentraciones de oxígeno la tendencia es a una mayor asociación (ligar más oxígeno), razón por la cual se explica que en los pulmones, donde la concentración de oxígeno es alta, la hemoglobina se oxigene y en los tejidos, donde la concentración de oxígeno es muy baja, transfiera su oxígeno con bastante facilidad. Un factor muy importante relacionado al comportamiento de la hemoglobina es el pH, la hemoglobina muestra una tendencia a liberar oxígeno cuando el pH del medio en el cual se encuentra es bajo, lo que ocurre en los tejidos por la presencia de altas concentraciones de anhídrido carbónico, a esto se le conoce con el nombre de *Efecto Bohr*^(3,8). Este hecho de disminución de la afinidad de la hemoglobina para el oxígeno cuando desciende el pH de la sangre está estrechamente relacionado con el hecho de que la desoxihemoglobina fija protones de los grupos polares en el canal de 20Å de ancho de la hemoglobina con más fuerza que la oxihemoglobina.

En la *Figura N°9* se muestra las curvas de oxigenación de hemoglobina y mioglobina humanas en condiciones fisiológicas. La curva de la hemoglobina es sigmoideal y la de la mioglobina es hiperbólica. A bajos valores de presión de oxígeno la mioglobina tiene mayor afinidad por el O_2 que la hemoglobina^(3,8,25).

El equilibrio que expresa la curva de oxigenación de la mioglobina es el siguiente⁽²⁵⁾:



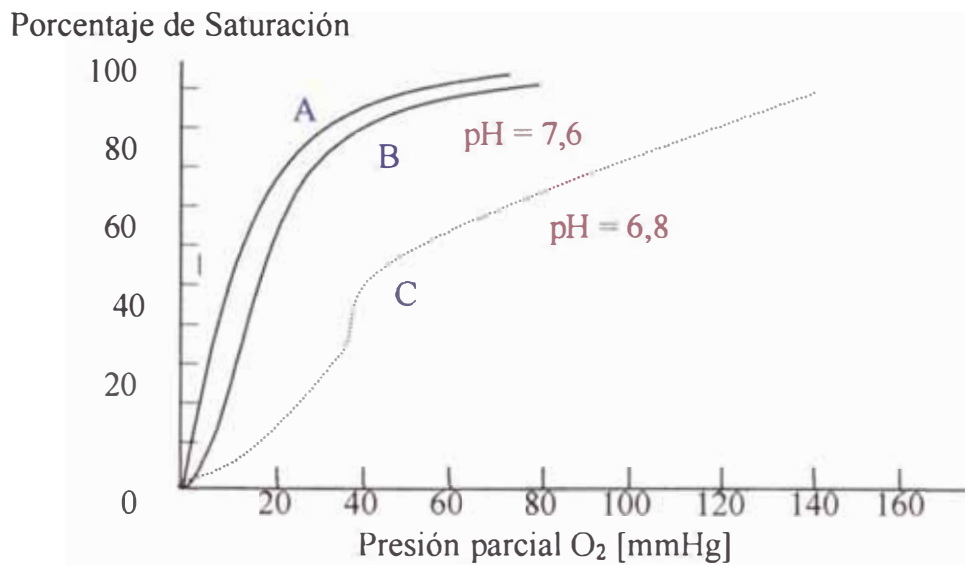
$k_1, k-1$ Constantes cinéticas

K_1 Constante de equilibrio

$$\theta = \text{Saturación} = \frac{[MbO_2]}{[Mb]_{total}} = \frac{K'_1 \times P O_2}{1 + K'_1 \times P O_2} = \frac{K_1 [O_2]}{1 + K_1 [O_2]}$$

K'_1 Constante de equilibrio considerando presiones

Figura N°9: Curvas de fijación de O₂ para la mioglobina (A) para la hemoglobina (B), mostrando la dependencia de esta última con el pH (C): Efecto Bohr⁽³⁾



Esta ecuación puede transformarse en⁽²⁴⁾:

$$\frac{\theta}{1-\theta} = K'_1 \times P O_2 = K_1 [O_2]$$

Sin embargo la curva de oxigenación de la hemoglobina tiene la siguiente ecuación⁽²⁵⁾:

$$\frac{\theta}{1-\theta} = K'_1 \times P O_2 = K_1 [O_2]^n \quad n = 2,8$$

Debido a que la hemoglobina es un tetrámero, hay una interacción cooperativa entre sus subunidades. Si un oxígeno ingresa se desencadena una variación conformacional en la cadena polipeptídica, que se trasmite a las subunidades adyacentes, a esto se le conoce como efecto alostérico, además en la hemoglobina existe un canal de 20Å de ancho que presenta grupos polares, un cambio del pH determina que se presente el *Efecto Bohr*.

De lo anterior se desprende que la hemoglobina posee 4 constantes de equilibrio para la entrada de los 4 oxígenos (*Tabla N°2*):

Tabla N°2: Efecto Bohr para la Hemoglobina Humana (K torr⁻¹, a 19°C)⁽²⁵⁾

Constante	pH = 7,1	pH = 9,1
K ₁	0,0493	0,240
K ₂	0,0427	0,464
K ₃	0,221	0,732
K ₄	0,320	1,992

La estabilidad de la mioglobina y hemoglobina se debe a que la globina que se pliega sobre el grupo hemo produciendo un ambiente hidrofóbico, permitiendo la entrada de oxígeno pero no de agua, hace que los grupos hemo se mantengan separados a fin de no permitir la dimerización de los átomos de hierro con puentes oxo que degenerarían en la formación de *Fe (II)* inutilizando el transporte de oxígeno.

La *Tabla N°3* proporciona datos sobre la interacción de algunas otras moléculas pequeñas con el *Fe (II)* del grupo hemo de la hemoglobina (*Hb*) y mioglobina (*Mb*). El *CO* es un ligando un poco más fuerte que el *O₂*, el *NO* es un ligando muy fuerte frente al *Fe (II)* del grupo hemo⁽²⁴⁾. También pueden unirse *R₂S*, *R₃P*, *C₂H₅NC*⁽³¹⁾ etc.

Tabla N°3: Interacción de la Hb y Mb con otras moléculas⁽²⁵⁾

Moléculas	Hemoglobina (20°C)	Mioglobina (20°C)	Mioglobina (20°C)
	K ₄ : HbX ₃ ↔ HbX ₄ Orina: pH = 9,1	K: Mb + X ↔ MbX Humana: pH = 7,45	K: Mb + X ↔ MbX Caballo: pH = 7,0
<i>O₂</i>	6,7 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁵	8,5 x 10 ⁵
<i>CO</i>	2,6 x 10 ⁸	4,7 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁷
<i>NO</i>	1,5 x 10 ¹¹		
<i>C₂H₅NC</i>	1,66 x 10 ⁵		

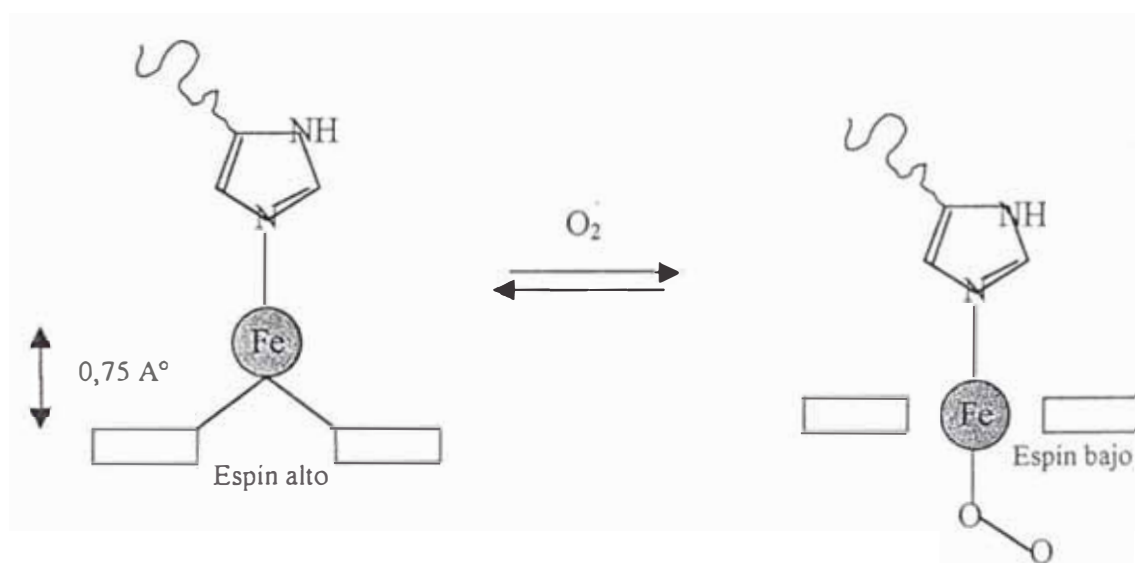
1.2.2 Mecanismo de Oxigenación:

El mecanismo de oxigenación ha sido descrito por *Perutz*: existe una interacción entre un oxígeno y un grupo hemo, que afecta la posición de la cadena proteica unida al grupo alterándose también las otras cadenas, éste es un *Mecanismo Disparador*⁽⁸⁾.

La estructura electrónica del *Fe (II)* presente en la desoxihemoglobina (pentacoordinada) es de espín alto (t_{2g})⁴ (e_g)² y el compuesto es paramagnético, con cuatro electrones desapareados. Este *Fe (II)* tiene un radio de 0,78 Å siendo la distancia *Fe-N* en el grupo hemo de 2,18 Å, puesto que el radio del espacio disponible al centro del anillo porfirínico es de 2,00 a 2,05 Å el átomo de *Fe* se situará 0,8 Å a 0,75 Å por encima del plano del grupo hemo. Esto implica que el orbital dx²-y² que apunta directamente hacia los cuatro nitrógenos porfirínicos, está ocupado por un electrón, lo que producirá una cierta repulsión entre el mismo y las densidades electrónicas de estos nitrógenos. Esta supuesta repulsión también es minimizada por el alejamiento del hierro del plano porfirínico.

Cuando una molécula de O_2 se liga al hierro, generando oxihemoglobina y ocupando la sexta posición de coordinación se produce una alteración en el valor de la fuerza del campo cristalino y la configuración electrónica del $Fe(II)$ pasa a ser de bajo espín y el centro metálico para a ser diamagnética, al aparear todos sus electrones en la configuración $(t_{2g})^6 (e_g)^0$. Como el radio iónico del $Fe(II)$ de espín bajo se hace más pequeño en $0,17 \text{ \AA}$ que el correspondiente al de espín alto la distancia $Fe-N$ disminuye hasta alrededor de 2 \AA ya que el efecto repulsivo habrá desaparecido al quedar vacío el orbital dx^2-y^2 encajando ahora en el agujero del anillo porfirínico, jalando hacia sí a la histidina que a su vez produce un tensionamiento en la subunidad a la que pertenece y alterando toda la proteína, el efecto global es que dos grupos hemo se acercan entre sí 1 \AA mientras que los otros dos se alejan 7 \AA ; estos cambios estructurales se llaman *Efecto Cooperativo o Efecto Alostérico*^(3,8) (Figura N°10).

Figura N°10: Esquema que muestra el desplazamiento del $Fe(II)$ durante la fijación de O_2 : Mecanismo Disparador y que origina el Efecto Alostérico⁽³⁾



Si la incorporación de un ligando relativamente débil como el O_2 a la esfera del $Fe(II)$ puede producir este cambio en la configuración electrónica del hierro, ligandos más fuertes como CO , NO , PF_3 , S , C_2H_5NC etc. pueden competir con el O_2 por la sexta posición de coordinación en torno al hierro y llegar a desplazarlo. Por lo tanto, bloquean esa posición de coordinación y el sistema ya no puede fijar oxígeno resultando incapaz de cumplir con su función esencial de transporte.

1.2.3 Estructuras del Mecanismo de Oxigenación:

Existen dos modelos principales sobre la estructura de la hemoproteína oxigenada, de un lado **Pauling y Weiss**⁽²⁵⁾ plantean una estructura del tipo metal-vinilo con enlace σ y retrodonación π del *Fe (II)* al O_2 , Weiss supone que habría transferencia electrónica del hierro al oxígeno, formando el superoxo compuesto *Fe (III)-O₂*; de otro lado **Griffith y Gray**⁽²⁵⁾ plantean una estructura del tipo complejo π con el oxígeno en estado singulete ($^1\Delta_g$) y el *Fe (II)* en estado de espín bajo. Inicialmente el O_2 antes de interactuar se encuentra en estado de triplete ($^3\Delta_g$) (Figura N°11) y el hierro pentacoordinado, en estado de espín alto ($S=2$); según los modelos de Pauling y Griffith (Figura N°12) luego de la unión el O_2 se encuentra en estado de singulete y el *Fe (II)* en estado de espín bajo ($S=0$); según Weiss, sin embargo, se tendría O_2^- en estado de doblete ($S=1/2$) y el *Fe (III)* en estado de espín bajo ($S=1/2$), el diamagnetismo del complejo es explicado por Weiss en función de una interacción del tipo antiferromagnética entre los dos espines.

Figura N°11: Orbitales Moleculares para el O_2 ⁽¹⁰⁾

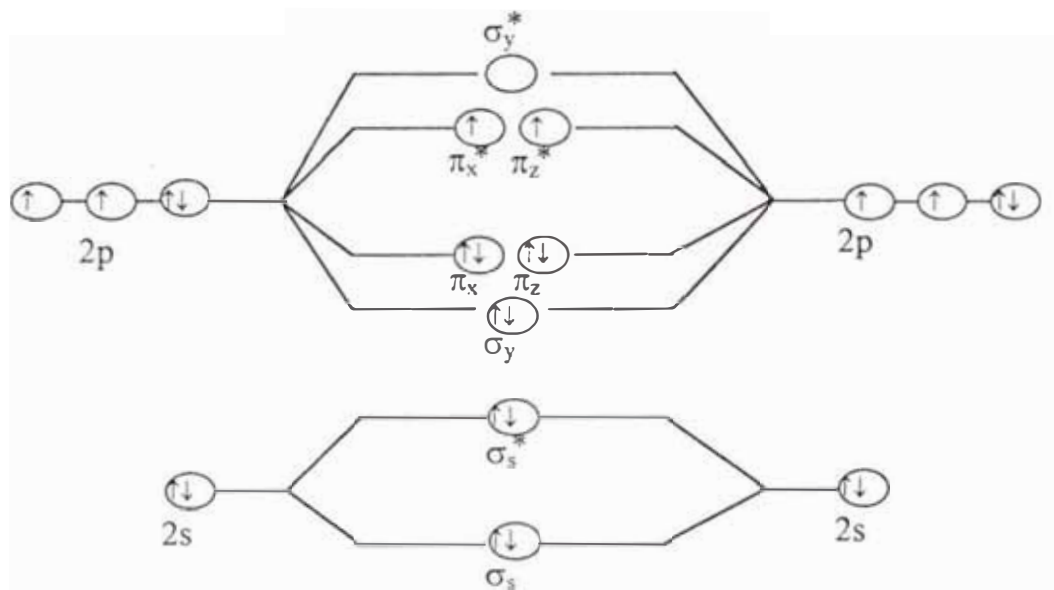
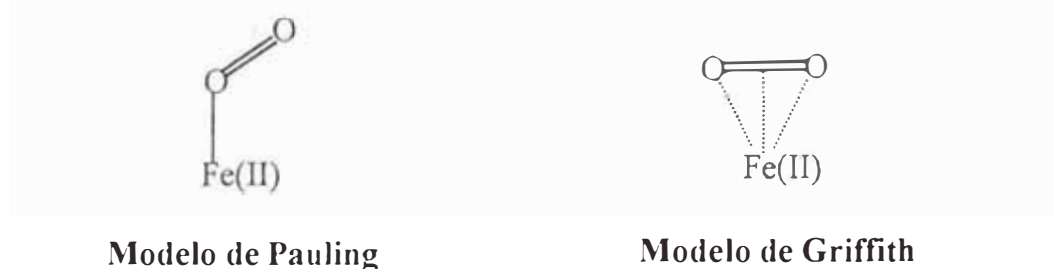


Figura N°12: Configuraciones posibles para la unión Fe-O₂⁽²⁴⁾

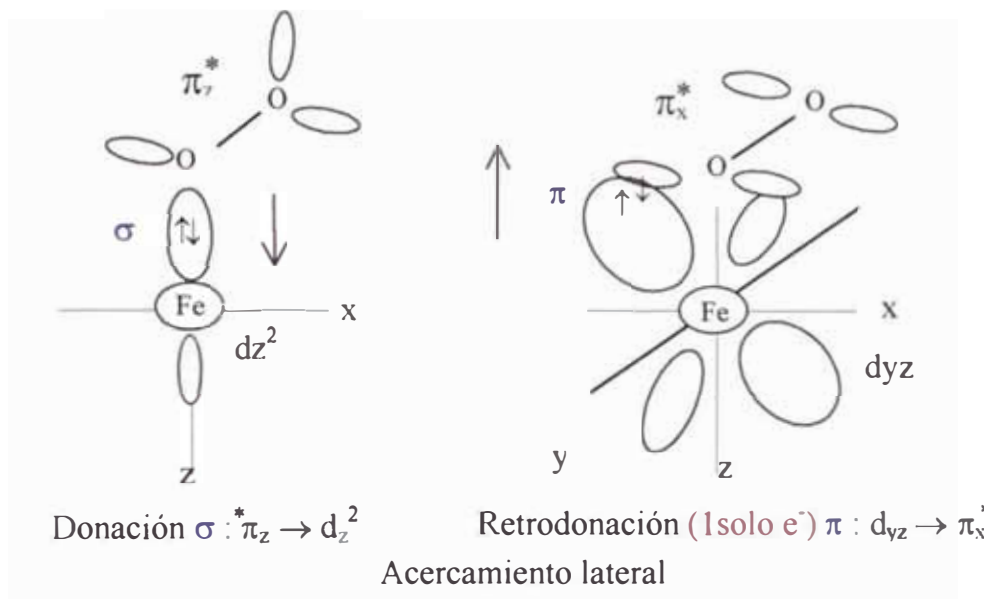


La espectroscopia óptica establece una coincidencia de las medidas observadas y la estructura del *Fe (II)* en estado de espín bajo, la espectroscopia Mössbauer no manifiesta resultados acordes con los espectros ópticos, aparentemente la carga efectiva del *Fe (II)* en la oxihemoglobina y carboxihemoglobina es muy cercana a la del complejo *Hb-Fe (III)* (debida a la retrodonación), en particular hay coincidencia entre la estructura electrónica de *Hb-O₂* con los complejos de citocromos donde el hierro está en estado de oxidación (III) y espín bajo; no obstante estudios recientes indican que ello se debería a la presencia del ligando macrocíclico (anillo porfirínico).

Para comprobar la reversibilidad del oxígeno se ha venido experimentando desde la década de 1930 con complejos de Co, Ir y Pt. En la década de 1950, Wang insertó ferroporfirina *Fe (II)* en poliestireno y notó la absorción reversible de *O₂*, descubriéndose que el *Fe (II)* se oxida al formarse puentes *Fe (III)-O₂-Fe(III)*, lo cual se evita bloqueando el entorno de cada grupo hemo.

Un estudio de difracción por rayos X de una molécula modelo mostró la validez del modelo de Pauling para la oxihemoglobina⁽²⁵⁾ (Figura N°13).

Figura N°13: Solapamiento de orbitales en la unión Fe-O₂⁽³⁾



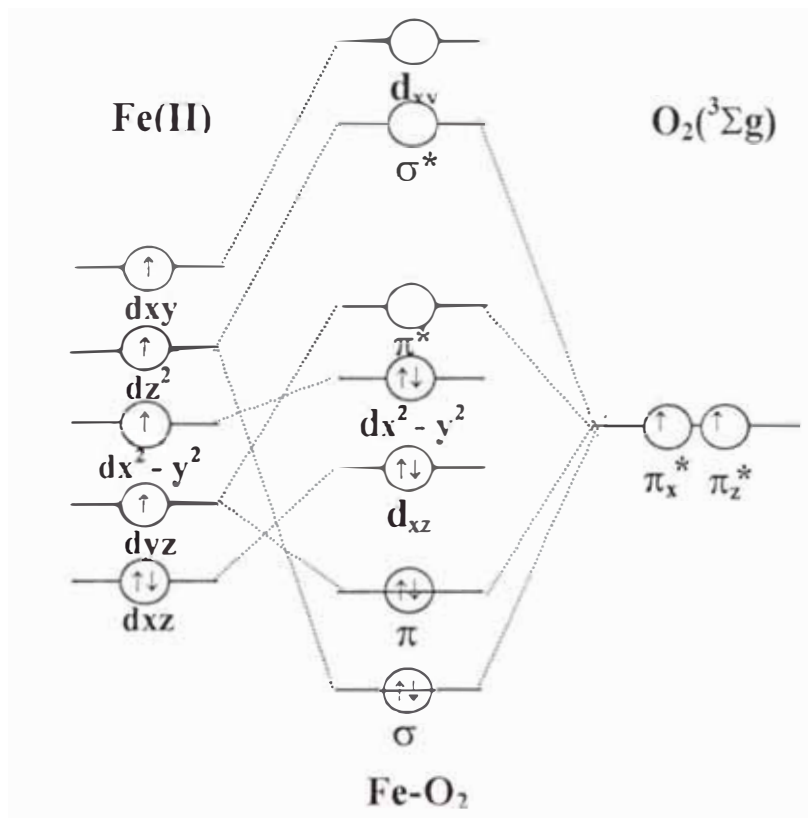
El *O₂* se comporta como un ligando donador σ y aceptor π , puede transferir densidad electrónica al centro metálico electropositivo y aceptar, por un mecanismo de retrodonación densidad electrónica proveniente de ese centro y que irá a sus orbitales π^* parcialmente desocupados.

El mecanismo para la formación de la oxihemoglobina diamagnética a partir de *O₂* (triplete) con el complejo de *Fe (II)* en espín alto supondría la aproximación lateral del *O₂*, el acoplamiento de sus electrones desapareados π_x^* y π_z^* con los electrones del

metal en dz^2 y dyz , produciendo interacción enlazante σ y π , no habiendo barreras electrónicas para la coordinación (Figura N°14: Diagrama Orbital Molecular del Fe- O_2).

Es importante remarcar que en este diagrama se ha considerado el Fe (II) en coordinación 5, mientras que la discusión ha considerado un desdoblamiento octaédrico (t_{2g} y e_g), lo que no afecta la validez de lo analizado⁽³⁾.

Figura N°14: Diagrama Orbital Molecular del Fe- O_2 ⁽²⁵⁾



1.2.4 Propiedades Espectroscópicas de la Hemoglobina al combinarse con gases⁽³¹⁾:

La propiedad fisiológica más característica e importante de la hemoglobina, es la facilidad con que se combina con el oxígeno en forma reversible. El compuesto que resulta, **oxihemoglobina** HbO_2 puede liberar todo el oxígeno colocando la solución al vacío, la molécula sin el oxígeno recibe el nombre de **hemoglobina reducida** y se representa como Hb , se puede obtener de la oxihemoglobina por la acción de agentes reductores como el bisulfito de sodio $NaHSO_3$, el sulfuro de amonio y las sales ferrosas. Las soluciones de oxihemoglobina son de color rojo brillante, las de hemoglobina reducida púrpura rojizo. La sangre arterial contiene principalmente HbO_2 y la venosa una mezcla de HbO_2 y Hb .

El oxígeno se une a la hemoglobina en una forma tan débil, que puede ser desplazado por otros gases que forman compuestos más estables. El monóxido de carbono es el de mayor interés práctico por ser un contaminante en las ciudades. El burbujeo de CO en una solución de oxihemoglobina da como resultado la formación de **carboxihemoglobina**, $HbCO$ desplazando oxígeno. La solución de carboxihemoglobina tiene un color rojo característico que se suele describir como rojo cereza. La $HbCO$ es más estable que la oxihemoglobina, el CO no se puede desplazar con agentes reductores, solo se puede desprender de la molécula burbujeando O_2 por algún tiempo, o en presencia de N_2 o H_2 .

El óxido nítrico forma un compuesto aún más estable con la hemoglobina, el NO forma con el grupo hemo la **nitroxidohemoglobina** (color rojo).

La **sulfohemoglobina** se forma con el sulfuro de hidrógeno H_2S , y es también un compuesto estable e irreversible, tiene el color verde sucio, no es cierto que la formación de éste compuesto sea la razón principal de la toxicidad del H_2S . La sulfohemoglobina se encuentra en la sangre en un padecimiento raro, la sulfohemoglobidemia.

La **cianohemoglobina**, que se forma al unirse la hemoglobina con el ácido cianhídrico no se forma directamente de la oxihemoglobina y el HCN , y no es la razón de la toxicidad de éste, el compuesto se forma entre la metahemoglobina y el HCN .

La **metahemoglobina** es la hemoglobina oxidada, en la cual la sexta posición de coordinación del hemo férrico se encuentra en su forma ácida fijada a una molécula de agua (color marrón) o en la forma alcalina, a un grupo hidroxilo formando las **hematinas** $Hb(Fe\ III)-OH$ (color rojo oscuro). No es capaz de actuar como transportador de oxígeno debido a la pérdida de electrones de los iones hemo. La metahemoglobina se une también o otros iones negativos como el cianuro CN para formar la **metacianohemoglobina** $Hb(Fe\ III)-CN$.

Todos los derivados de la hemoglobina mencionados se pueden distinguir en solución mediante su espectro de absorción en la región UV-VIS (*Tabla N°4*).

Tabla N°4: Algunas propiedades de los derivados de la Hemoglobina y Mioglobina⁽²⁵⁾

Compuesto	Espectro Óptico $\lambda_{\text{máx}}$ nm (ϵ mM)	Datos Mössbauer Is(mm/s) Qs(/mm/s)	Propiedades Magnéticas
Hb reducida	565	0,90 2,40	Espín alto (S = 2)
HbO ₂	414 (127) 541 (14,7) 577 (15,6)	0,24 1,89 – 2,24 dependiente)	Espín bajo (temp. (S = 0)
HbCO	418 (154) 539 (14,7) 570 (14,5)	0,18 0,36 independiente)	Espín bajo (temp. (S = 0)
Hb(Fe III)-OH ⁻	411 (71) 540 (9,7) 570 (8,5)	0,17 1,65	Mezcla de espín alto y espín bajo
Hb(Fe III)-CN ⁻	422 (116) 543 (11,3) 570 hombro	0,15 1,50	Espín bajo (S = 1/2)
HbS	540 578 618		
MbO ₂	418 (128) 543 (13,6) 581 (14,6)		Espín bajo (S = 0)
MbCO	433 (187) 542 (14,2) 579 (12,2)		Espín bajo (S = 0)

1.3 EFECTO DEL MONÓXIDO DE CARBONO EN LA HEMOGLOBINA:

1.3.1 Contaminante biológico:

El monóxido de carbono es uno de los contaminantes más difundidos y más frecuentes del aire. La causa principal de contaminación con CO es la combustión incompleta de los carbones y los hidrocarburos empleados para la propulsión de vehículos, para la calefacción de edificios y para procesos industriales. La formación de CO es común en los vehículos de combustión interna; en consecuencia se acumula en las zonas urbanas, cerca de las vías rápidas y las calles de gran movimiento y varía en concentraciones conforme aumenta y disminuye el flujo del tránsito^(7,26).

A los niveles en que se encuentra en el aire urbano, el CO no parece afectar a las plantas, pero es venenoso para los seres humanos. El CO representa una amenaza para la salud por su capacidad de reaccionar con la hemoglobina formando la **Carboxihemoglobina** ($HbCO$). Cuando esta reacción se produce, la capacidad de la sangre para transportar oxígeno se ve reducida. La afinidad del CO por la hemoglobina es más de 200 veces superior que la del O_2 y, en consecuencia, cuando existan ambas posibilidades se formará antes $HbCO$ que HbO_2 ; ésta es la razón por la cual es peligroso respirar en presencia de aún pequeñas concentraciones de CO .

Los efectos del CO sobre la salud se estudian en términos de porcentaje de $HbCO$ en sangre⁽²⁹⁾. La concentración de carboxihemoglobina ($HbCO$) expresada como porcentaje de saturación es la medida bioquímica a la que se hace en general referencia como indicadora de la forma de CO ⁽³³⁾. No se han encontrado pruebas que indiquen efectos significativos sobre la salud cuando la concentración de $HbCO$ en sangre es inferior al 2%. Algunas pruebas indican que niveles de $HbCO$ entre el 2 y el 5% presentan un efecto de disminución sobre la ejecución de trabajos que precisan tiempo, discriminación visual o auditiva. Existen pruebas definitivas que muestran que los pacientes con enfermedades coronarias y enfisema son especialmente vulnerables a niveles de $HbCO$ superiores al 5%⁽²⁹⁾. En la *Tabla N°5* se resumen los efectos sobre la salud de diversos niveles de $HbCO$ en sangre.

Tabla N°5: Efectos sobre la salud de los niveles de *HbCO* en sangre⁽³⁰⁾

Nivel de <i>HbCO</i> en Sangre (% <i>HbCO</i>)	Efectos demostrados
Menos de 1	Sin efectos aparentes
1-2	Algunas pruebas de efecto sobre la eficacia del comportamiento
2-5	Efectos sobre el sistema nervioso central. Deterioro de la discriminación de los intervalos de tiempo, agudeza visual, discriminación del brillo y algunas otras funciones psicomotrices.
5-10	Cambios funcionales cardiacos y pulmonares
10-20	Tensión en la frente, dilatación de los vasos sanguíneos
20-30	Dolor de cabeza y latidos en la sien
30-40	Dolor de cabeza agudo, cansancio, mareo, vista cansada, náuseas, vómitos, postración
40-50	Lo mismo que lo anterior mas respiración y pulso acelerados, asfixia y postración
50-60	Lo mismo que lo anterior mas coma, convulsiones, respiración acelerada
60-70	Coma, convulsiones, respiración y pulso débiles. La muerte es posible
70-80	Desaceleración de la respiración, muerte en horas
80-90	Muerte en menos de 1 hora
90-100	Muerte en pocos minutos

El nivel de *HbCO* en sangre está en relación directa con la concentración de *CO* en el aire inhalado. Para una concentración dada de *CO* en el aire ambiental, el nivel de *HbCO* en la sangre llegará a una concentración de equilibrio después de un período de tiempo suficiente. Este nivel de equilibrio de *HbCO* se mantendrá mientras los niveles de *CO* en el aire ambiental no cambien. Sin embargo, el nivel de *HbCO* variará lentamente en la misma dirección que la concentración de *CO* ambiental al establecerse un nuevo equilibrio.

Los procesos metabólicos originan un nivel de fondo en la *HbCO* sanguínea, de más o menos el 0,5% en las personas normales (*producción de CO endógeno*). Los niveles superiores se atribuyen al *CO* contenido en el aire respirado. El porcentaje en el equilibrio de *HbCO* en la corriente sanguínea de una persona continuamente expuesta a

una concentración de *CO* en el aire ambiental inferior a 100 ppm puede calcularse fácilmente gracias a la siguiente ecuación⁽³⁰⁾:

$$\% \text{ HbCO en Sangre} = 0,16 \times [\text{Concentración de CO del Aire en ppm}] + 0,5$$

Los valores de la *Tabla N°6* se obtuvieron usando esta ecuación.

Tabla N°6: Equilibrio de *HbCO* en sangre y el *CO* en el aire⁽³⁰⁾

Concentración de <i>CO</i> en el aire ambiental (ppm)	Concentración de equilibrio de <i>HbCO</i> en sangre (%)
10	2,1
20	3,7
30	5,3
50	8,5
70	11,7

El tiempo requerido para que el nivel de *HbCO* en sangre alcance el equilibrio con la concentración de *CO* en el aire ambiental es función de la actividad física de la persona expuesta.

Entre 1969 y 1972 se realizó un estudio de los niveles de *HbCO* en sangre en la población de los Estados Unidos⁽²⁹⁾, el estudio supuso la recolección y análisis de muestras de sangre venosa procedente de 29000 donantes que vivían en diversas comunidades urbanas, suburbanas y rurales de dicha nación. El fumar, la localización geográfica, la ocupación y las condiciones meteorológicas se vio que influenciaban los niveles de *HbCO*. Las variables como raza, sexo, edad, talla y peso, no resultaron ser factores significativos.

La variable aislada más dominante resultó ser el fumar. El estudio muestra que los fumadores usualmente presentan unos niveles de *HbCO* entre dos y cuatro veces superiores a los no fumadores; el aumento está directamente relacionado con la cantidad de tabaco consumido. El nivel de *CO* en el humo del tabaco que alcanza los alvéolos se estima en 200 ppm. En la *Tabla N°7* se compara los niveles de *HbCO* en fumadores y no fumadores, en las diversas zonas incluidas en la investigación; también puede verse las variaciones en la concentración de *HbCO* según la geografía.

Tabla N°7: Porcentajes medios de *HbCO* e intervalo del 90% para fumadores y no fumadores de los Estados Unidos⁽²⁹⁾

Localidad	Fumadores de cigarrillos	No fumadores
Anchorage	4,7 (0,9-9,5)	1,5 (0,6,-3,2)
Chicago	5,8 (2,0-9,9)	1,7 (1,0-3,2)
Denver	5,5 (2,0-9,8)	2,0 (0,9-3,7)
Detroit	5,6 (1,6-10,4)	1,6 (0,7-2,7)
Honolulu	4,9 (1,6-9,0)	1,4 (0,7-2,5)
Houston	3,2 (1,0-7,8)	1,2 (0,6-3,5)
Los Ángeles	6,2 (2,0-10,3)	1,8 (1,0-3,0)
Miami	5,0 (1,2-9,7)	1,2 (0,4-3,0)
Milwaukee	4,2 (1,0-8,9)	1,2 (0,5-2,5)
Nueva Orleans	5,5 (2,0-9,6)	1,6 (1,0-3,0)
Nueva York	4,8 (1,2-9,1)	1,2 (0,6-2,5)
Phoenix	4,1 (0,9-8,7)	1,2 (0,5-2,5)
St. Louis	5,1 (1,7-9,2)	1,4 (0,9-2,1)
Salt Lake City	5,1 (1,5-9,5)	1,2 (0,6-2,5)
San Francisco	5,4 (1,6-9,8)	1,5 (0,8-2,7)
Seattle	5,7 (1,7-9,6)	1,5 (0,8-2,7)
Vermont, New Hampshire	4,8 (1,4-9,0)	1,2 (0,8-2,1)
Washington, D.C.	4,9 (1,2-8,4)	1,2 (0,6-2,5)

El estudio también puso de manifiesto marcadas diferencias en los niveles de *HbCO* entre grupos ocupacionales. Estudiantes y amas de casa presentaban los niveles más bajos. Los más elevados pertenecían a grupos relacionados con vehículos y a personas dedicadas a la elaboración de metal, productos químicos, cristal o piedra; a la imprenta, soldadura autógena, reparaciones y montaje eléctricos, y artes gráficas.

Los niveles de *HbCO* en los conductores de taxis resultaron ser los más elevados de todos los grupos ocupacionales estudiados. Los resultados de una prueba realizada con catorce taxistas no fumadores de Nueva York ilustran este punto: ocho de ellos que acababan de finalizar su jornada de trabajo tenían un nivel medio de *HbCO* del 2,5%, con una variación desde 1,3 hasta 5,8%. Seis taxistas que iban a incorporarse al trabajo presentaban un nivel medio de 1,2%, y una variación del 1,0 al 1,5%.

El *CO* tiene una vida media en la sangre de unas cinco horas⁽³⁰⁾.

1.3.2 Mecanismo de Carboxilación:

El efecto de ligando carbonilo (*Figura N°15*) es de bloquear el sistema de transporte de oxígeno y se puede explicar en función de orbitales (*Figura N°16*) y su correspondiente diagrama energético (*Figura N°17*). Es similar al del $Fe-O_2$ y la diferencia está en la mayor estabilidad alcanzada por la energía de los enlaces formados con el CO debido a la mayor capacidad donante y al mayor efecto de retrodonación.

Figura N°15: Diagrama Orbital Molecular del $CO^{(10)}$

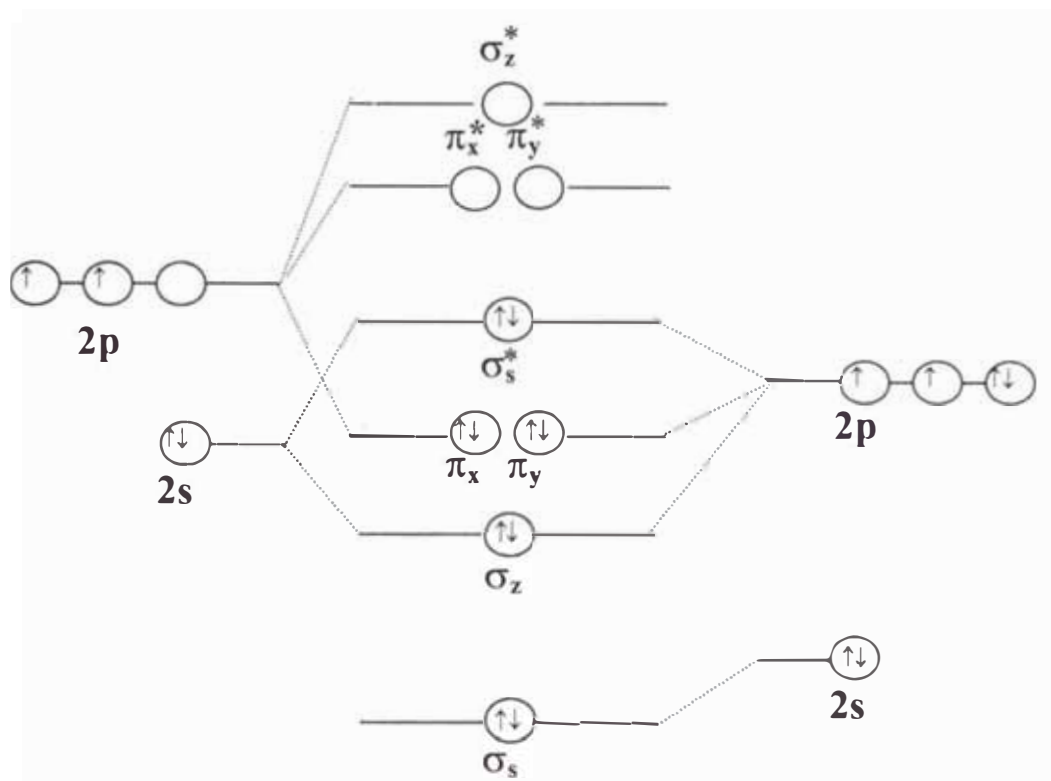


Figura N°16: Solapamiento de orbitales en la unión Fe-CO

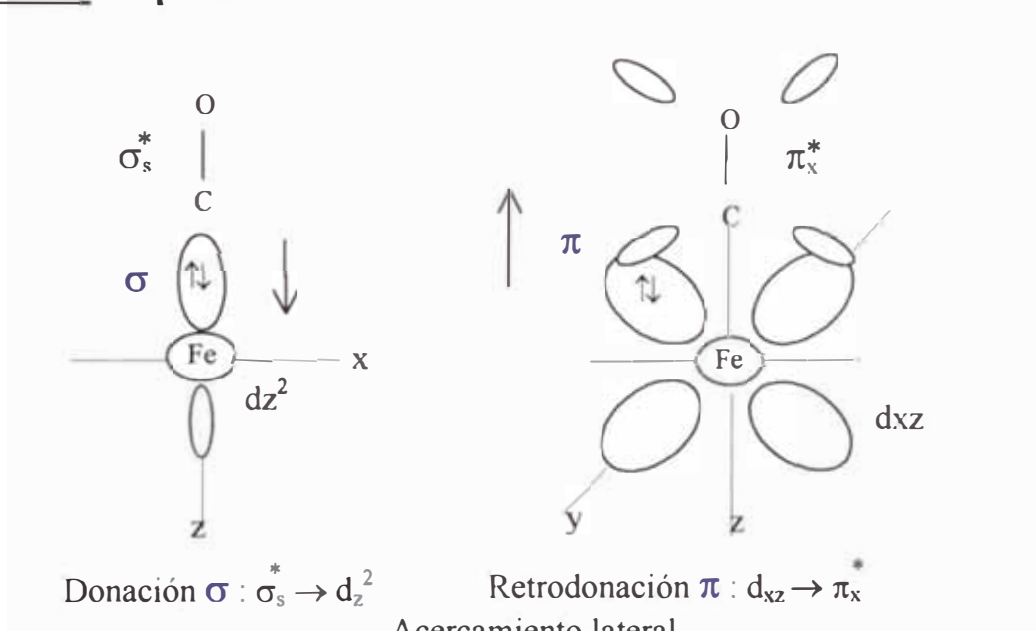
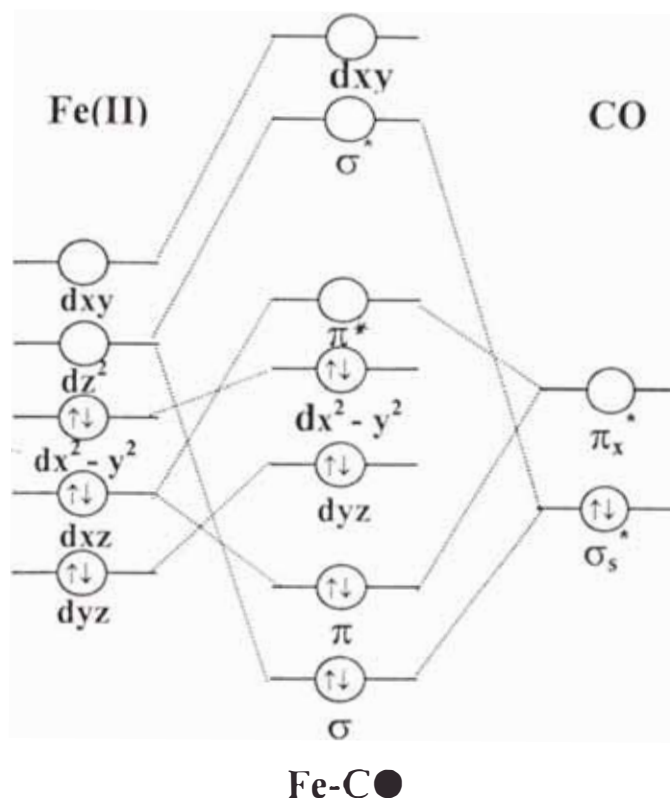


Figura N°17: Diagrama Orbital Molecular Fe-CO



1.3.3 Concentraciones de la Carboxihemoglobina por consumo de tabaco⁽⁷⁾:

En estudios prospectivos y retrospectivos se ha identificado el hábito de fumar cigarrillos como uno de los principales factores en el desarrollo de enfermedades coronarias. El riesgo de que se desarrollen enfermedades coronarias en fumadores de pipa y cigarrillos (Tabla N°8) es, en apariencia mucho menor del que corren quienes fuman cigarrillos, pero mayor que el de no fumadores. Los fumadores de cigarrillos inhalan más que los que fuman cigarrillos quienes, a su vez, inhalan más que los que fuman pipa, pero hay diferencias individuales muy marcadas que depende de la forma en que se consume el tabaco, el modo de fumar y la profundidad de inhalación. Además, los estudios experimentales indican que el tabaco puede contribuir a la aparición y agravamiento de coronariopatías por acción de varios mecanismos independientes o complementarios; uno de ellos es la formación de concentraciones importantes de carboxihemoglobina. La intervención de la carboxihemoglobina en el desarrollo del cáncer parece insignificante y no se ha comprobado. La posible interacción de CO y otros elementos que forman el humo, que puede producirse en los pulmones y en otros tejidos para inducir alteraciones patológicas, aún debe esclarecerse.

Las exposiciones importantes probablemente están relacionadas con factores microambientales y el consumo de cigarrillos, antes que con la contaminación atmosférica de la comunidad. El consumo de cigarrillos produjo concentraciones de carboxihemoglobina más elevadas que las resultantes de la exposición a las concentraciones de *CO* presentes, en la atmósfera de la calle.

Es muy poco el *CO* que se absorbe en la boca y en la laringe (aproximadamente el 5%), de tal modo que la mayor parte del *CO* disponible para la transferencia a la *Hb* debe llegar a los alvéolos para elevar la concentración de *HbCO* presente en la corriente sanguínea. Los individuos que consumen gran cantidad de cigarrillos pueden tener concentraciones de *HbCO* de hasta el 15 al 17%. La concentración de *CO* en el humo que se inhala a través de los cigarrillos es de alrededor 4% (v/v) (Tabla N°8).

Tabla N°8: *CO* (%v/v) en el humo que se inhala a través del cigarrillo o cigarro⁽⁷⁾

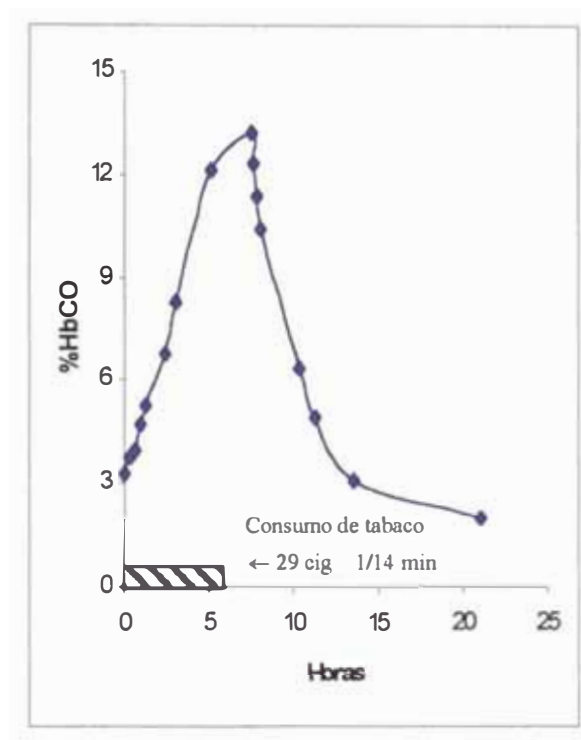
Cigarrillo sin filtro	Cigarrillo con filtro	Cigarro 85 mm	Cigarro 95 mm
4,6	4,5	5,3-11,1	7,1

Las clases de tabaco presentan diferencias en la composición de la hoja y la estación de cultivo. Los tipos para cigarros se distinguen por su alto contenido de nitrógeno (nicotina), de minerales y poco de carbohidratos a diferencia de los cigarrillos. La manipulación en la fabricación de los cigarros y cigarrillos es diferente⁽²¹⁾

Se ha estimado que el fumador de cigarrillos puede estar expuesto a una concentración de *CO* de 460 a 575 mg/m³ (400 a 500 ppm) durante los aproximadamente 6 minutos necesarios para consumir un cigarrillo. Landaw (1973) observó que el tiempo medio de la eliminación del *CO* en los fumadores era de unos 291 minutos. La *Figura N°18* muestra el patrón de cambio de la *HbCO* en un típico fumador de cigarrillos. La inserción de un catéter intravenoso permitió el muestreo frecuente de la sangre de este fumador. El sujeto fumaba sólo durante sus horas de trabajo y tenía una carga inicial de *HbCO* de 1,7%. Las personas que fuman, por lo general exhalan *CO* a la atmósfera en lugar de inhalarlo del medio.

Una serie de estudios han señalado que el hábito de fumar reduce la capacidad de trabajo, esta disminución está relacionada directamente con la concentración de *HbCO* presente en el sujeto.

Figura N°18: Concentraciones de *HbCO* en un típico fumador de cigarrillos (Horvath)⁽⁷⁾



Existe considerable evidencia experimental y epidemiológica que pone de relieve la asociación entre fumar involuntariamente y las condiciones adversas para la salud.

El humo de tabaco contiene tanto material particulado (*la mayoría del cual está dentro del rango respirable < 1 um*) como componentes gaseosos. Se presentan en la *Tabla N°9* el *CO*, *nicotina* y *partículas totales* junto con los rangos típicos de concentración en cámaras experimentales y ambientes interiores. Otros componentes incluyen dimetilnitrosamina, acroleína, acetaldehído, formaldehído, *NO* y *NO*₂, α -benzopireno, fenoles, naftalenos, trazas de metales, cianuro de hidrógeno, amoníaco y polonio-210 radioactivo (HEW, 1979)⁽³³⁾.

Tabla N°9: Mediciones de los constituyentes principales del Humo de Tabaco⁽³³⁾

Constituyente	Localización	Ventilación: cambios de aire por hora	Cantidad de tabaco consumido	Concentración
CO	Habitaciones de 80- 170 m ³	6,4 - 2,3	46 - 101 cigarrillos	4,5 - 7,5 ppm
CO	Automóvil pequeño, cámara de 25 m ³	Ninguna	4 - 9	12 - 110 ppm
CO	Oficina, club con restaurante, taberna, local para espectáculos	-	-	2,5 - 28 ppm
Nicotina	Submarino, bote, automóviles, autobús, aeroplano	Ninguna - 20	4 - 150 cigarrillos	3 - 33 ppm
Nicotina	Habitaciones de 57 - 80 m ³	6,4 - 8,2	42 cigarrillos, 9 puros	< 0,1 - 0,42 mg/m ³
Nicotina	Habitaciones de 38- 170 m ³	Ninguna	10 cigarrillos, 9 puros	0,13 - 1,04 mg/m ³
Nicotina	Submarino, terminal, restaurante	-	Hasta 150 cigarrillos	1 - 35 ug/m ³
Partículas totales	Casas de 15 - 425 m ³	1 - 3	7- 35 cigarrillos	1,2 - 3,0 mg/m ³
Partículas totales	Cámara de 25 m ³	Ninguna	4- 24 cigarrillos	2,28 - 16,65 mg/m ³
Partículas totales	Taberna, local para espectáculos	Ninguna - 6	-	0,15 - 0,98 mg/m ³

En la *Tabla N°10* se indican los factores actuales de emisión por cigarrillo para cierto número de dichas sustancias. El humo producido por la corriente principal es el que inhalará el fumador y los factores de emisión son representativos de las condiciones de preinhalación. El humo de las corrientes laterales está constituido principalmente por el humo sin filtrar emitido por el cigarrillo, puro o pipa, que no se inhalan en el momento. Los factores de emisión del humo de las corrientes laterales son, por tanto, más útiles para la caracterización de los ambientes interiores en los que se permite fumar⁽³³⁾.

Estos datos reportados de la *Tabla N°9 y 10* están de acuerdo a condiciones ambientales normales realizadas y evaluadas en los Estados Unidos⁽³³⁾.

Tabla N°10: Factores de emisión de las corrientes principal y lateral del humo de cigarrillos⁽³³⁾

Constituyente	Corriente principal ug/cigarrillo	Corriente lateral ug/cigarrillo	Relación entre la corriente lateral y la principal
Características generales			
Duración de la producción del humo	20 segundos	550 segundos	27
Cantidad de tabaco quemado	347 mg	411 mg	1,2
Número de partículas por cigarrillo	$1,05 \times 10^{12}$	$3,5 \times 10^{12}$	3,3
Número de diámetro medio de las partículas	0,2 um	0,15 um	0,75
CO	1000-20000	25000-50000	2,5
Nicotina	100-2500	2700-6750	2,7
Partículas suspendidas totales	36200	25800	0,7

1.3.4 Métodos de Evaluación del CO en Sangre:

Para la medición del CO sanguíneo se describen tres métodos según la Organización Mundial de la Salud en su manual de selección de procedimientos: el de determinación espectrofotométrica, difusión de Conway y el método NDIR. Los dos últimos se basan en la determinación del CO desprendido en la descomposición química de la carboxihemoglobina.

El *Método Espectrofotométrico* se basa en la determinación de los máximos de absorción de las radiaciones en la región visible del espectro de la HbCO disuelta en agua con una pequeña cantidad de amoníaco. Las longitudes de onda de la banda de absorción se eligen de manera que la interferencia entre el espectro de la HbCO y el de la HbO₂ quede reducida al mínimo. Para efectuar la evaluación se comparan los espectros de absorción de la muestra de sangre previamente disuelta y de una porción de esa misma solución tratada con burbujas de O₂ para que se oxigene toda la hemoglobina. El espectro resultante sirve de base para determinar el porcentaje % de HbCO. Una ventaja es la posibilidad de operar con muestra de poco volumen, el procedimiento es determinar la proporción de hemoglobina convertida en carboxihemoglobina por comparación de espectros, pero requiere el empleo de un espectrofotómetro de una resolución mínima de 0,5nm. Un elemento de error es la presencia de otros pigmentos sanguíneos, capaces o no de combinarse con el CO y el

O_2 . Este método es extremadamente preciso y la acción de las sustancias extrañas se reduce al mínimo utilizando una solución de referencia de HbO_2 obtenida por extracción del CO . Las sustancias que sí se combinan con el CO (mioglobina) sólo tienen importancia si están en la misma concentración que la Hb . El análisis dura 20 minutos, pero 15 se dedican a la oxigenación de las muestras. La temperatura del orden de $3^\circ C$ mantiene estables las muestras durante una semana. El método permite detectar concentraciones de 0,2% de $HbCO$ y su reproducibilidad es satisfactoria.

El *Método de la cubeta de difusión de Conway* se basa en la reacción del CO extraído de la sangre con cloruro de paladio (II). Se coloca la muestra de sangre en la cubeta de microdifusión y se trata con ácido sulfúrico para provocar la descomposición de la carboxihemoglobina con desprendimiento de CO , que se absorbe en una solución de cloruro de paladio (II). Los productos de la reacción son CO_2 , Pd y HCl . La cantidad de HCl obtenida en la reacción se determina por titulación con azul de bromofenol. La reacción se efectúa en una cubeta de diseño especial (*cubeta de microdifusión de Conway*). La sensibilidad del método es considerable, límite de detección inferior 0,3% de $HbCO$. La reproducibilidad es satisfactoria, pero el análisis lleva más tiempo que el análisis espectrofotométrico.

El *Método NDIR* se basa en el análisis de la absorción de los rayos infrarrojos por el CO de la sangre. Para descomponer la $HbCO$ se trata la muestra de sangre con ácido fosfórico a $100^\circ C$, en un recipiente al vacío, conocido como el Método de Nicloux. Puede medirse concentraciones inferiores a 25 mL de CO por cada 100 mL de sangre con una precisión de 0,05%. El método es rápido, pero exige un instrumental relativamente complicado⁽²⁶⁾.

Existen otros métodos basados en el *Método de Nicloux* para la extracción de CO , que consiste en extraer de la sangre los gases que contenga por reacción de la hemoglobina con ácido fosfórico y se utiliza el aparato de *Nicloux* quedando libres el oxígeno, dióxido de carbono, pequeñas cantidades de nitrógeno, ácido sulfhídrico y monóxido de carbono cuya determinación cuantitativa se puede realizar por diversos métodos⁽³²⁾:

- ✓ Eudiométricos (gasométricos)
- ✓ Cromatografía en fase gaseosa
- ✓ Volumétrico o espectrofotométrico después de reducción del $PdCl_2$
- ✓ CO-Oxímetro (Espectrofotometría automatizable)

Se puede aplicar la técnica de *Cromatografía de Gases de Fenkle* para la determinación de monóxido de carbono en la sangre, utilizando helio como gas portador⁽³²⁾.

1.4 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA POR MONÓXIDO DE CARBONO:

La aplicación de los métodos para la determinación de monóxido de carbono en sangre permite relacionarlo con la concentración de monóxido de carbono en equilibrio absorbido y medir su nivel ambiental⁽³⁰⁾.

1.4.1 Propiedades Fisicoquímicas^(14,21):

El monóxido de carbono CO es el contaminante del aire más abundante y ampliamente distribuido, de los que se encuentran en la capa inferior de la atmósfera. Gas a todas las temperaturas superiores a su punto de ebullición de $-192^{\circ}C$, es incoloro, inodoro e insípido⁽²⁶⁾. Presenta una densidad del 96,5% de la del aire, y no es apreciablemente soluble en agua. Es inflamable y arde con llama azul, pero no mantiene la combustión.

Densidad	: 0,97 (aire=1)
Punto de Fusión	: $-199^{\circ}C$
Punto de Ebullición	: $-191,5^{\circ}C$
Límites de Explosión	: 125-74%
Temperatura de Ignición	: $608,9^{\circ}C$
Solubilidad	: Parcialmente en agua; soluble en benceno y ácido acético

1.4.2 Límites Permisibles de la concentración de CO en el Aire:

Tabla N°11: Estándares Internacionales de CO en el Aire^(4,18)

País	Monóxido de Carbono ug/m ³
U.S.A.	
USEPA. 1994. National Air Quality and Emissions Trends Report. Office of Air Quality Planning and Standards. US Environmental Protection Agency.	40000 (Promedio 1 hora) 10000 (Media 8 horas)
TLV-TWA (ACGIH) 1993-1994	
Threshold Limit Value-Time Weighted Average por American Conference of Governmental Industrial Hygienists.	25 ppm (7-8 horas)
Europa	100000 (15 minutos)
WHO. 1987. Air Quality Guildelines for Europe.	60000 (30 minutos)
WHO Regional Publications. European Series N°23.	30000 (Promedio 1 hora)
World Health Organization. Regional Office for Europe. Copenhagen	10000 (Media 8 horas) 700 (24 horas)
México	
Gobierno de la República de México. 1990. Programa Integral sobre la Contaminación Atmosférica	14872 (Media Móvil de 8 horas)
Japón	
Enviromental Pollution Control. 1969. Clean Air Around the World. Internacionl Union of Air Pollution Prevention Association. Japon	22,9 ppm (Promedio 1 hora) 11,45 ppm (Media diaria, promedio 24 horas)
Perú	
DIGESA. Propuesta de Patrones de Calidad de Aire en el Perú. Dirección General de Salud Ambiental. Ministerio de Salud. 1996	01 hora: 44* ppm 50000 ug/m ³ 08 horas: 20 ppm 23000 ug/m ³
INAPMAS	
Proyecto Patrones para Contaminantes Químicos. Instituto Nacional de Protección del Medio Ambiente para la Salud. 1993	01 hora: 44* ppm 50000 ug/m ³ 08 horas: 20 ppm 23000 ug/m ³
D.S. 046-93-EM	
Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos. Tabla 2: Concentración Máxima Aceptable de Contaminantes en el Aire. Sub-Sector Hidrocarburos-Ministerio de Energía y Minas. 1993	01 hora: 30 ppm 35000 ug/m ³ 08 horas: 13 ppm 15000 ug/m ³
* No debe ser excedido más de una vez al año.	

1.4.3 Métodos de Evaluación del CO en el Aire⁽²⁶⁾:

Para la medición del CO atmosférico se describen tres métodos según la Organización Mundial de la Salud en su manual de selección de procedimientos: uno basado en la técnica de absorción no dispersiva de infrarrojos (NDIR); otro basado en la cromatografía de gases y un tercero de análisis semicuantitativo en tubos de detección.

El *Método NDIR* es un método automatizable, que está considerado como el más fidedigno para la evaluación de las concentraciones de CO en el aire ambiente, se basa en la absorción de las radiaciones infrarrojas por la molécula de CO.

El *Método de Cromatografía de Gases* es un método automatizable, consiste en la extracción del CO por una columna de separación del CH₄ y luego pasa a un tubo de reducción catalítica donde se combina con el hidrógeno convirtiéndose en CH₄. Es uno de los métodos más utilizados para las mediciones de CO en el aire y permite detectar, sin interferencias, concentraciones de 0,03 a 50 mg/m³.

Los *Tubos de Detección* pueden emplearse para la determinación de concentraciones de CO superiores a 5 mg/m³. Los tubos contienen gel de sílice u otro absorbente impregnado con un reactivo químico que cambia de color en presencia de aire con CO.

Los reactivos de uso más común son:

- ✓ Paladiosulfito potásico
- ✓ Mezcla incolora de pentóxido de yodo y ácido sulfúrico fumante
- ✓ Mezcla de sulfato de paladio y molibdato de amonio

Muchos tienen otras sustancias filtrantes que separan el humo y el polvo de la muestra de aire antes de que éste entre en contacto con el reactivo, y absorben los gases que pudieran causar interferencias. El método es simple y se considera como aproximación a la concentración efectiva de CO.

Hay otras formas de medir el CO atmosférico:

- ✓ Métodos Electroquímicos
- ✓ Valoración del Hg desprendido en la reacción entre el HgO y el CO
- ✓ Oxidación Catalítica o Electrolítica del CO con formación de CO₂
- ✓ Métodos de Infrarrojos
- ✓ Métodos Colorimétricos
- ✓ Métodos de Reducción: Reducción del I₂O₅, reducción del CuO y reducción de sales y complejos de Pd.

2. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental de este trabajo* sigue las siguientes etapas:

√ **Método Espectrofotométrico de medición del CO sanguíneo como Carboxihemoglobina (HbCO):** Estandarizar el método definiendo las longitudes de onda y estudiar algunas tendencias de los espectros de Hb, HbO₂ y HbCO.

√ **Pruebas Cualitativas de Identificación de la Carboxihemoglobina (HbCO):** Estudiar el comportamiento de la carboxihemoglobina formada frente a reactivos típicos.

Determinación de la Hemoglobina “Método de la Metacianohemoglobina”: Relacionar la hemoglobina de las muestras de sangre con su nivel máximo de saturación con monóxido de carbono en términos de absorbancias y establecer un rango de aplicación del método propuesto.

√ **Evaluación del Nivel de HbCO en no fumadores y fumadores de la Ciudad de Lima:** Aplicar el método modificado a una muestra de no fumadores y fumadores, establecer el nivel de carboxihemoglobina promedio de acuerdo a la cantidad de cigarrillos fumados y relacionarlo con los ppm de CO del ambiente. Para los fumadores se realiza una encuesta con el fin de proponer parámetros que puedan influir en el nivel de carboxihemoglobina.

√ **Determinación por Tubos Colorimétricos de la concentración de CO (ppm):** Hallar concentraciones de CO a partir de una cantidad de cigarrillos por esta técnica y relacionarlo con el nivel de carboxihemoglobina.

* El trabajo experimental se realizó en el Ambiente de Química Inorgánica del Lab. N°12 de la FC-UNI, en el Periodo 96-I a 98-I.

2.1 Método Espectrofotométrico de medición del CO sanguíneo como Carboxihemoglobina (HbCO): ^(26, 27)

Principio: El *Método Espectrofotométrico (OMS, 1976)*⁽²⁶⁾ se basa en la determinación de absorciones a las longitudes de onda máximas (*Anexo N°5*) de la hemoglobina, la oxihemoglobina y la carboxihemoglobina en una muestra de sangre venosa (*Anexo N°3 y 4*) (*2.1.1 Preparación de la Muestra de Sangre*).

La hemoglobina de la sangre se encuentra como oxihemoglobina HbO_2 , sólo una pequeña proporción como hemoglobina Hb libre y otra también pequeña combinada con los gases (CO , NO , H_2S , etc.) que se unen como resultado de la producción endógena y de la contaminación ambiental, este es el espectro de la hemoglobina Hb (*2.1.2.3 Hemoglobina*). Se realiza los espectros ópticos característicos (*Curvas Espectrales N°1 al 21*).

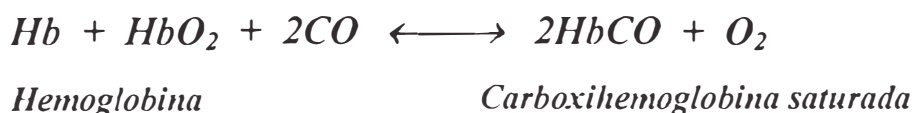
Cuando se satura la hemoglobina Hb de la sangre con O_2 (*Anexo N°1*) se desplazan todos los gases de ella y obtenemos la oxihemoglobina saturada $HbO_2 sat.$ (*2.1.2.1 Oxihemoglobina Saturada*). Se realiza los espectros ópticos característicos (*Curvas Espectrales N°22 al 32*).

Reacción Química:



Cuando se satura la hemoglobina Hb de la sangre con CO (*Anexo N°2*) obtenemos la carboxihemoglobina saturada $HbCO sat.$ (*2.1.2.2 Carboxihemoglobina Saturada*). Se realiza los espectros ópticos característicos (*Curvas Espectrales N°33 al 54*).

Reacción Química:



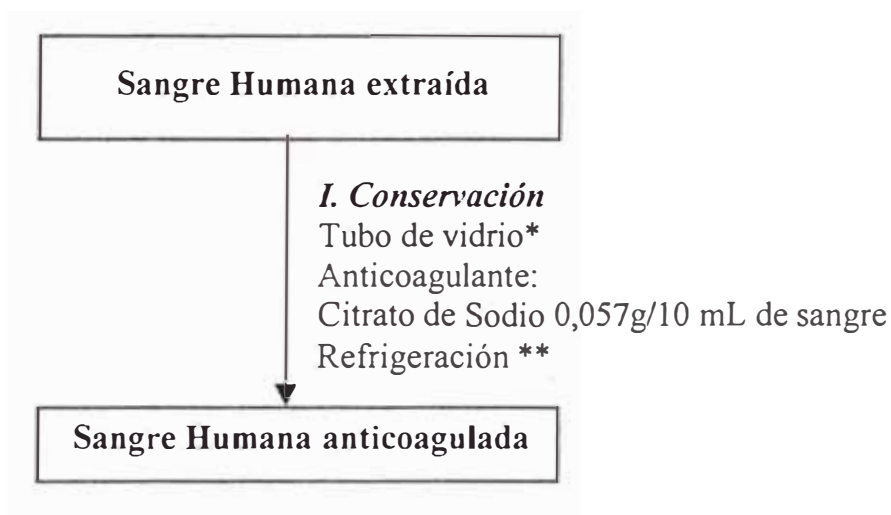
Las longitudes de onda se eligen de manera que la interferencia entre el espectro de la $HbCO$ y el de la HbO_2 quede reducida al mínimo.

Una vez establecidas las longitudes de onda experimentales se efectúa la evaluación del porcentaje de carboxihemoglobina en las muestras de sangre hallando la capacidad de oxigenación (espectros de hemoglobina y de oxihemoglobina saturada) y la capacidad de carboxilación (espectros de hemoglobina y de carboxihemoglobina saturada). La relación entre la capacidad de oxigenación y carboxilación de la muestra indica el porcentaje de carboxihemoglobina (*Cálculo del porcentaje de HbCO en Muestras de Sangre*).

Procedimiento Experimental:

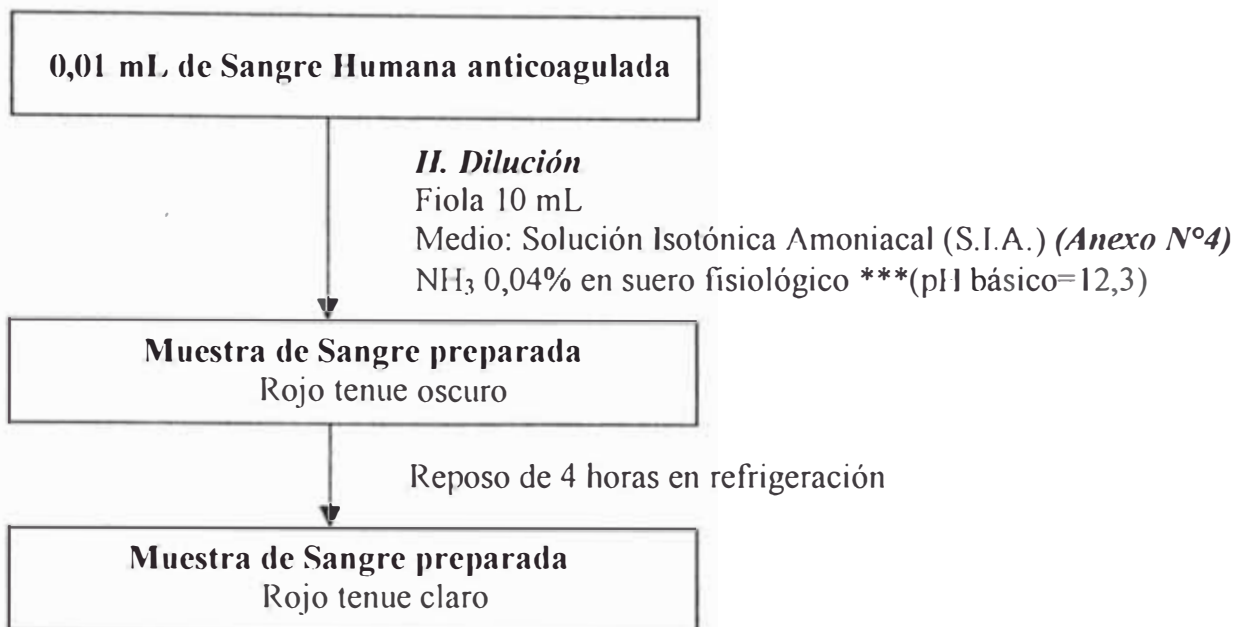
2.1.1 Preparación de la Muestra de Sangre:

2.1.1.1 Método inicial



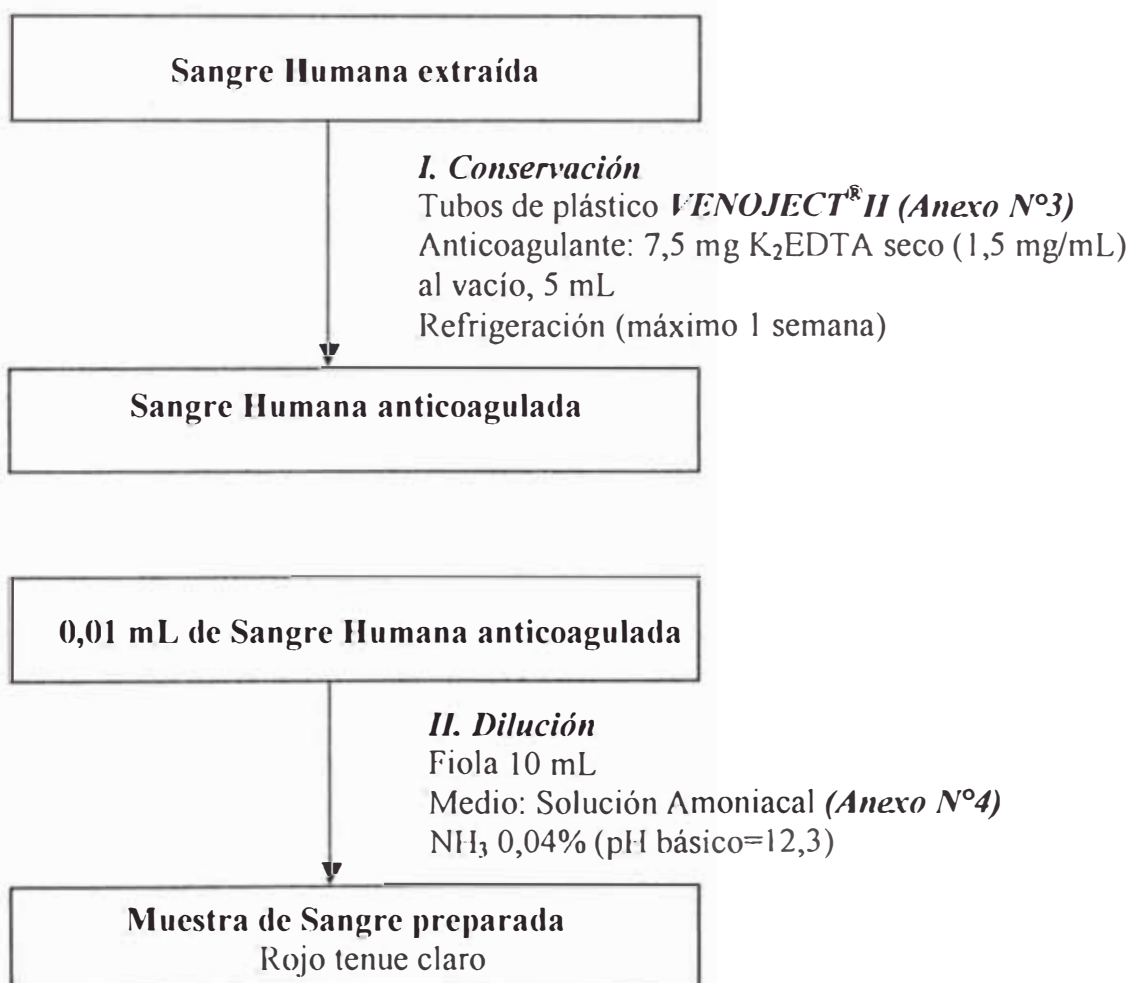
*Los tubos de vidrio fueron donados por el Centro Médico de la UNI.

**El tiempo de preservación de la sangre es de 2 semanas.



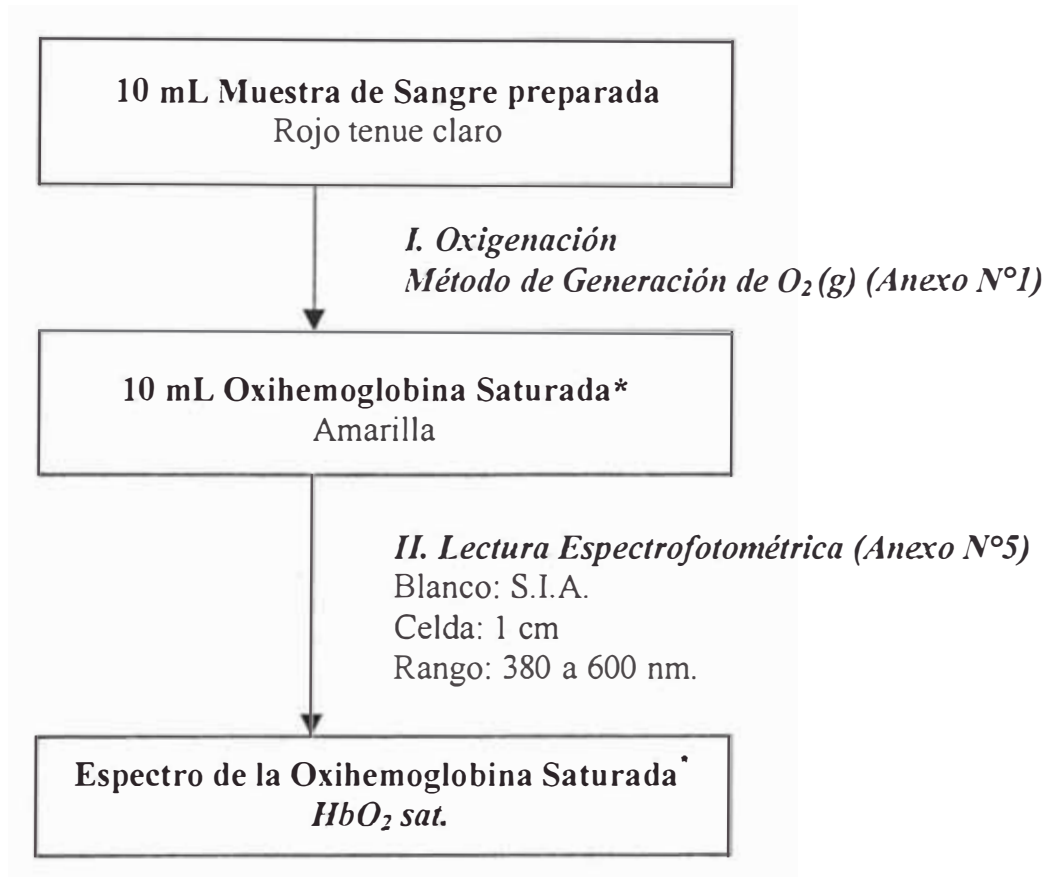
***El suero fisiológico empleado fue al 0,1% del estándar que es NaCl al 9%. En laboratorios clínicos la concentración de la sangre en la solución anticoagulante es de 500 mL de sangre en 50 mL de citrato sódico al 4% en solución isotónica de NaCl.

2.1.1.2 Método modificado



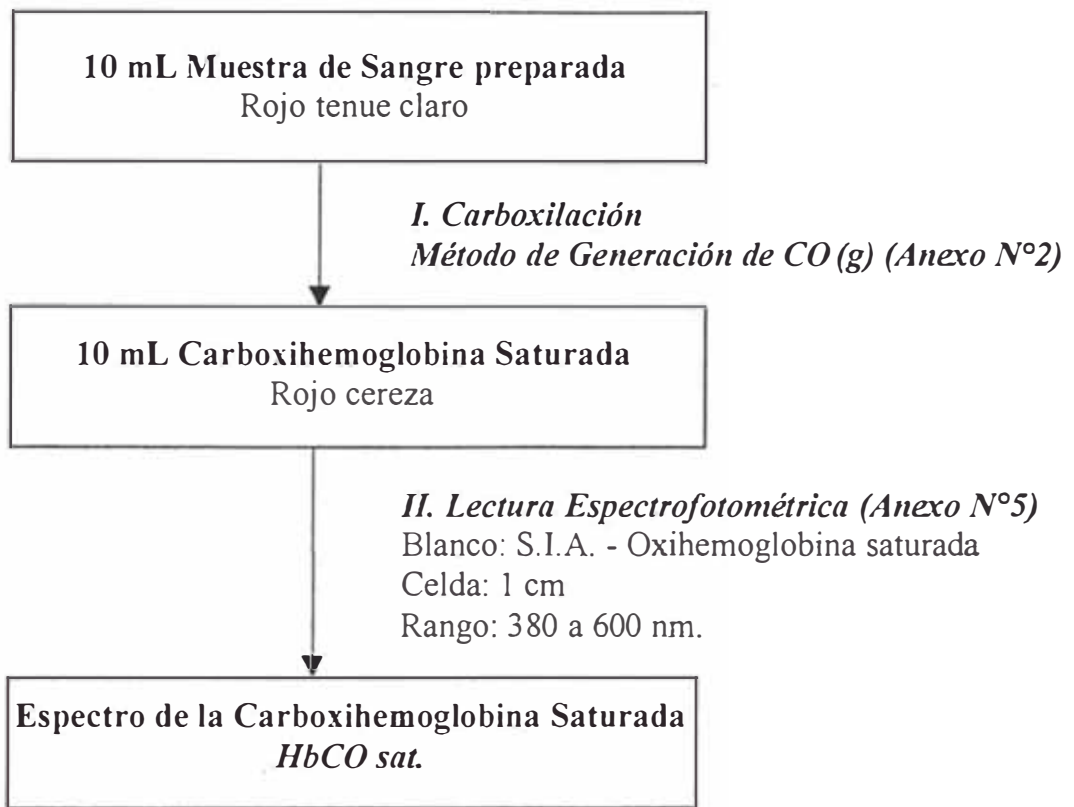
2.1.2 Procedimiento Experimental del Método Espectrofotométrico:

2.1.2.1 Oxihemoglobina Saturada (HbO_2)

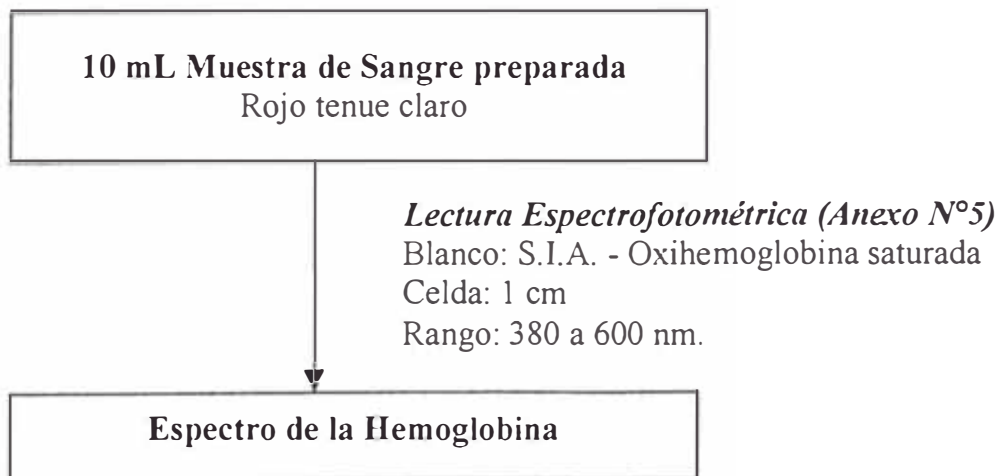


*La oxihemoglobina saturada tiene un tiempo de duración de 1 hora, ya que pierde oxígeno variando su espectro de absorción.

2.1.2.2 Carboxihemoglobina Saturada (HbCO)



2.1.2.3 Hemoglobina (Hb)



Cálculo del porcentaje de *HbCO* en Muestras de Sangre:

A partir de los espectros de absorción de la oxihemoglobina y carboxihemoglobina se determina el porcentaje de hemoglobina que se encuentra como carboxihemoglobina en las muestras de sangre (*Porcentaje de HbCO*).

Se toma como referencia una muestra de hemoglobina totalmente transformada en un compuesto estable como es la oxihemoglobina y se compara con el nivel provocado en la hemoglobina por la contaminación con monóxido de carbono como resultado de la producción endógena, de la contaminación ambiental y del nivel alcanzado durante el hábito de fumar.

El nivel de carboxilación de la hemoglobina se mide a través de la altura óptica en el máximo de absorción de la carboxihemoglobina, que es proporcional al *CO* enlazado a la hemoglobina. Este nivel será pequeño en muestras no contaminadas reflejando la producción endógena y será máximo en muestras totalmente contaminadas.

Definimos en el análisis cuantitativo los siguientes parámetros:

h = *Altura óptica* en unidades de absorbancia.

Experimentalmente se calcula en el espectro de hemoglobina de la muestra problema tomando como referencia la oxihemoglobina de la misma muestra y a partir de un punto referencial hallado (para evitar interferencias con otros pigmentos) en el espectro de la carboxihemoglobina se mide la altura en unidades de absorbancia (***A***) hasta el máximo de absorción de la carboxihemoglobina que es a λ (longitud de onda) = **416 nm**.

$$h = A(\lambda = 416 \text{ nm}) - \frac{A(\lambda = 410 \text{ nm}) + A(\lambda = 422 \text{ nm})}{2}$$

h₀ = *Altura óptica máxima* en unidades de absorbancia.

Experimentalmente se calcula de la misma forma que ***h*** pero en el espectro de la carboxihemoglobina saturada (muestra saturada con *CO*) tomando como referencia la oxihemoglobina de la misma muestra.

$$h_0 = A(\lambda = 416 \text{ nm}) - \frac{A(\lambda = 410 \text{ nm}) + A(\lambda = 422 \text{ nm})}{2}$$

Así la relación h/h_0 medirá la proporción de carboxihemoglobina presente en la muestra problema y reflejará la capacidad que tiene dicha hemoglobina en contaminarse con CO .

$$\frac{h}{h_0} \quad \text{Capacidad de la Hemoglobina en contaminarse con } CO$$

El nivel de oxigenación se mide a través de la diferencia óptica en el máximo de absorción de la hemoglobina que se hace mínimo en la oxihemoglobina y en la carboxihemoglobina (ya que el O_2 ha sido desplazado por el CO) siendo proporcional al O_2 enlazado a la hemoglobina. Este nivel será máximo en muestras sin contaminar y será mínimo en muestras oxigenadas o carboxiladas.

Definimos en el análisis cuantitativo los siguientes parámetros:

$d = \text{Diferencia óptica}$ en unidades de absorbancia.

Experimentalmente se calcula en el espectro de hemoglobina de la muestra problema tomando como referencia la oxihemoglobina de la misma muestra y a partir de un punto referencial en su espectro que corresponde a un mínimo se mide la altura en unidades de absorbancia (A) hasta el máximo de absorción que aparece en la hemoglobina que es a λ (longitud de onda) = 576 nm.

$$d = A(\lambda = 576 \text{ nm}) - A(\lambda = 560 \text{ nm})$$

$do = \text{Diferencia óptica mínima}$ en unidades de absorbancia tomando como referencia la disolución de la muestra de sangre.

Experimentalmente se calcula de la misma forma que d pero en el espectro de la oxihemoglobina saturada (muestra saturada con O_2) tomando como referencia la disolución de la muestra de sangre.

$$do = A(\lambda = 576 \text{ nm}) - A(\lambda = 560 \text{ nm})$$

Así la relación d/do medirá la proporción de oxihemoglobina presente en la muestra de problema y reflejará la capacidad que tiene dicha hemoglobina en oxigenarse.

$$\frac{d}{do} = \text{Capacidad de la Hemoglobina en oxigenarse}$$

Finalmente se halla el porcentaje de carboxihemoglobina presente en la muestra problema ($\%HbCO$):

$$\%HbCO = 100 \times \frac{\text{Capacidad de la Hemoglobina en contaminarse con CO}}{\text{Capacidad de la Hemoglobina en oxigenarse}}$$

Experimentalmente:

$$\%HbCO = 100 \times \frac{h}{ho} \times \frac{do}{d}$$

2.2 Pruebas Cualitativas de Identificación de la Carboxihemoglobina

(HbCO): ^(16,22)

Principio: Existen diversas reacciones para la investigación cualitativa de la hemoglobina. Se basan en pruebas de eliminación del O_2 donde la hemoglobina se convierte en hemoglobina desoxigenada.

Se utilizan en casos de intoxicación por monóxido de carbono para establecer rápidamente un nivel de carboxihemoglobina, ya que la carboxihemoglobina da prueba negativa por no tener oxígeno, manteniendo siempre el color cereza característico.

- La hemoglobina desoxigenada como complejo de *Fe (II)* pentacoordinado se reconoce por su color marrón oscuro (2.2.1 *Prueba de Desoxigenación*) y espectrofotométricamente (2.2.2 *Prueba Espectrofotométrica*) por presentar bandas características a 426 y 556 nm (*Curva Espectral N°55*).

En estas pruebas se reduce el oxígeno que libera la hemoglobina por acción del bisulfito de sodio.

Reacción Química:



Agente Reductor:



Bisulfito de Sodio

- La hemoglobina forma con el ácido tánico un precipitado marrón oscuro por eliminación del oxígeno y la carboxihemoglobina permanece de color rojo cereza (2.2.3 *Prueba del Ácido Tánico*).

La muestra de sangre problema se compara visualmente con la muestra de sangre contaminada y con la muestra de sangre sin contaminar, determinándose por el color la presencia o no de *HbCO* en ella.

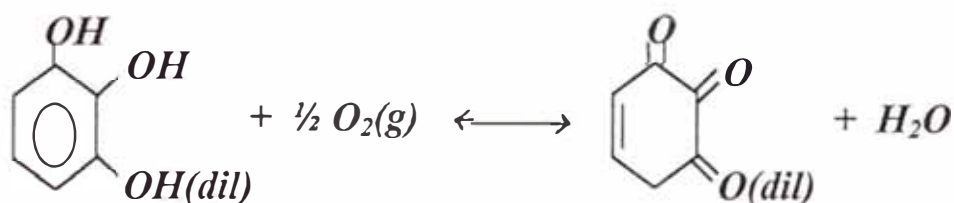
- La hemoglobina con los ácidos pirogálico y tánico forman un precipitado marrón en el caso de una sangre sin contaminar y en el caso de existir carboxihemoglobina se forma un precipitado de color rosa. El color del precipitado se distingue visualmente con la ayuda de patrones comparativos y sirve para determinar cualitativamente el nivel de carboxihemoglobina en sangre contaminada (2.2.4 Prueba del Ácido Pirogálico-Acido Tánico "Método de Sayers-Yant").

El ácido pirogálico reduce el oxígeno liberado de la hemoglobina formando compuestos quinónicos que aumentan el color.

Reacción Química:



Agente Reductor:

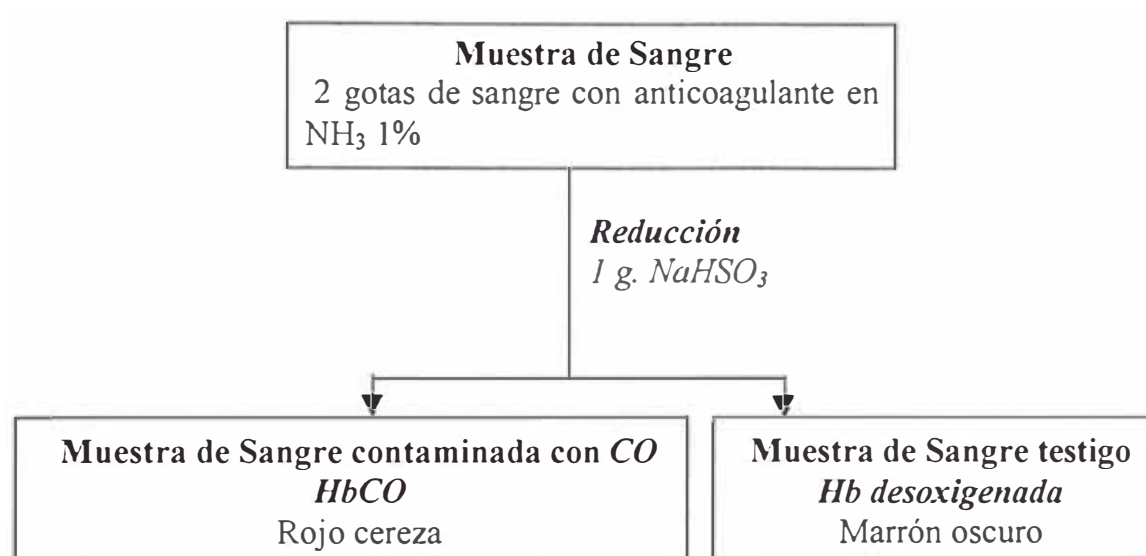


Acido Pirogálico

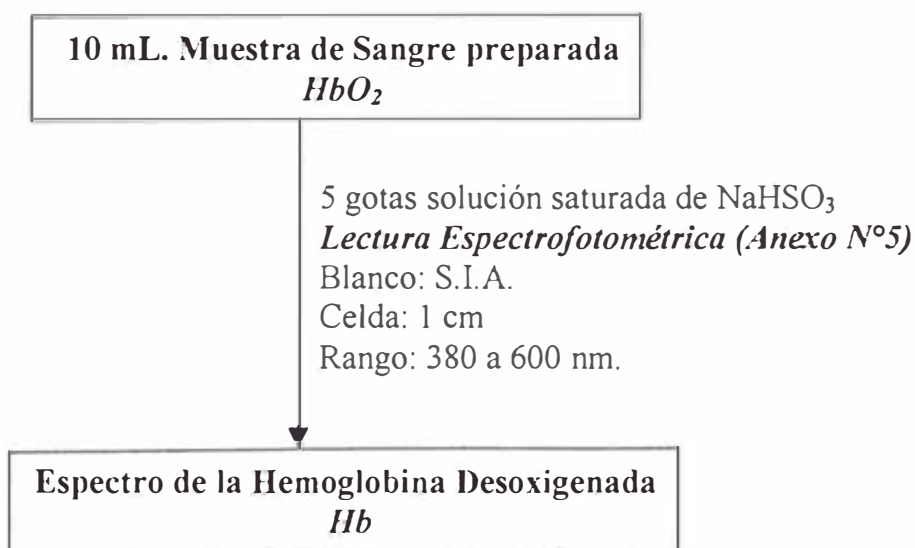
El reactivo de ácido pirogálico-ácido tánico debe prepararse en el momento de usarse y al ser adicionado no debe agitarse, si es necesario sumergir el tubo de reacción en agua fría como medida de precaución contra todo exceso de calentamiento.

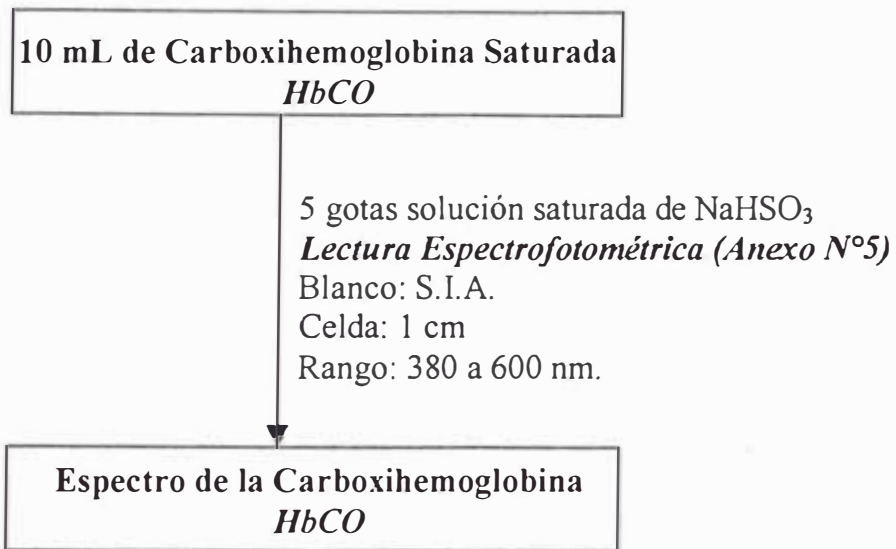
Procedimiento Experimental:

2.2.1 Prueba de Desoxigenación:

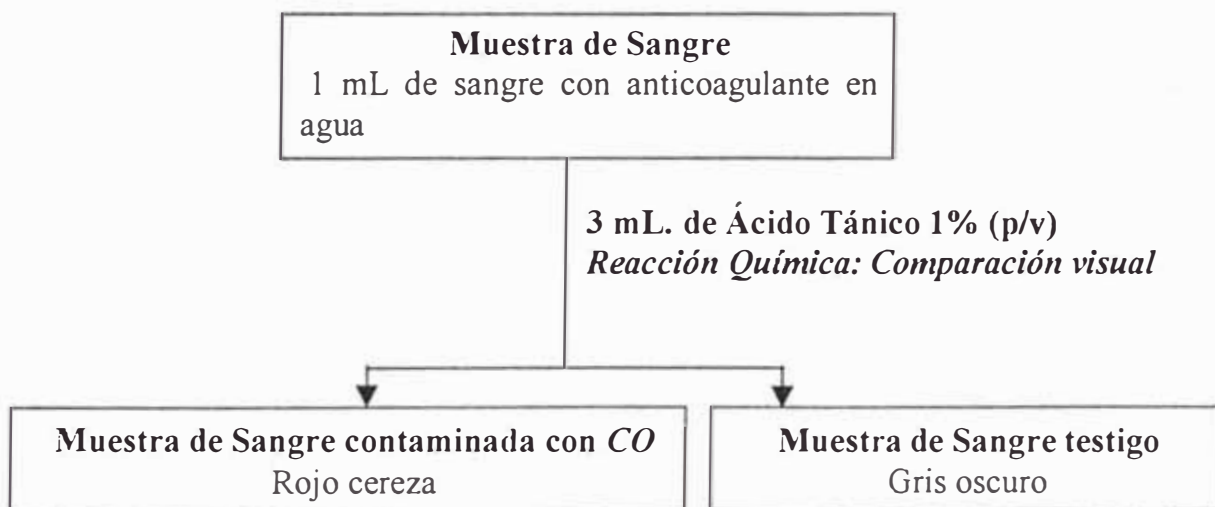


2.2.2 Prueba Espectrofotométrica:



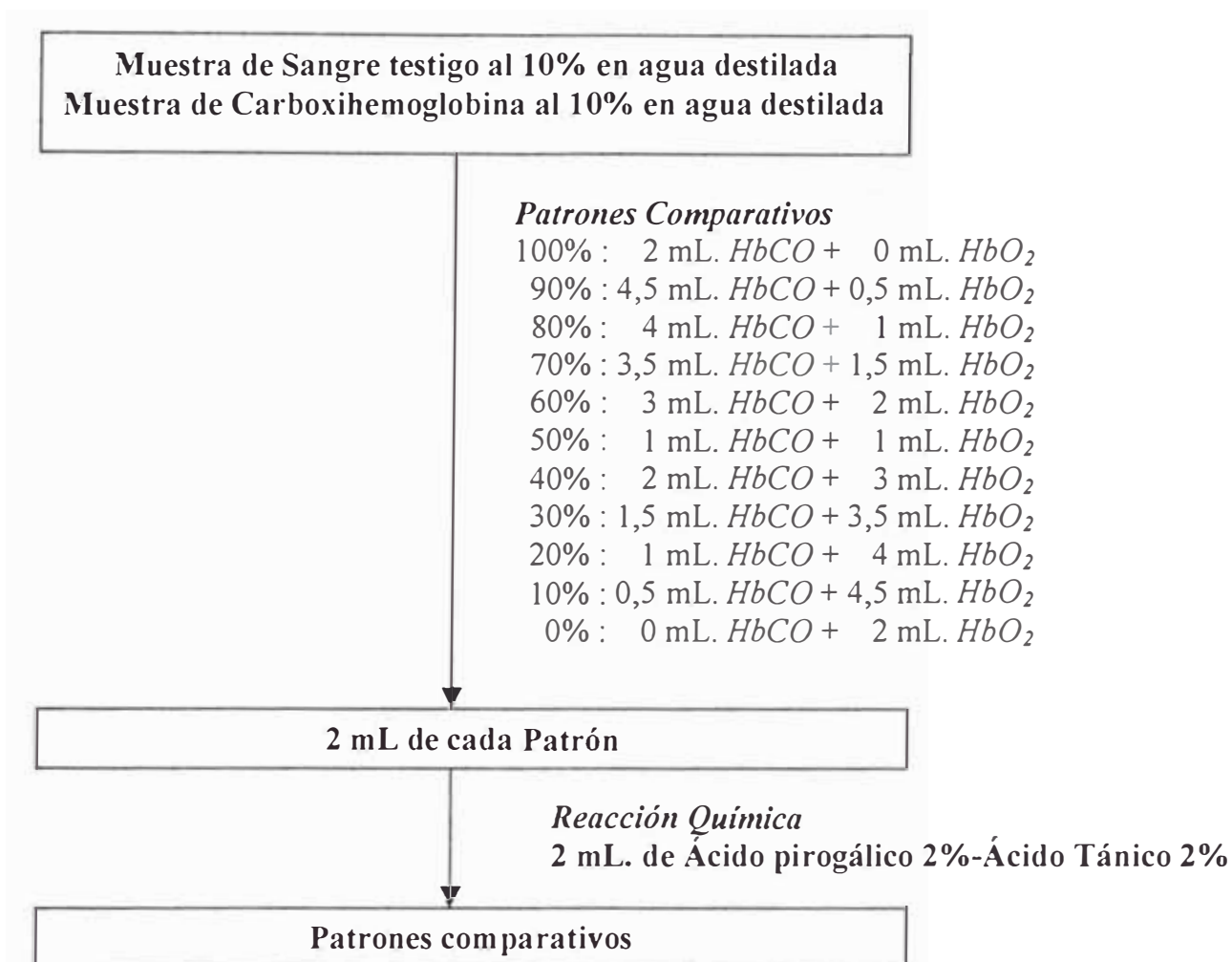


2.2.3 Prueba del Ácido Tánico:

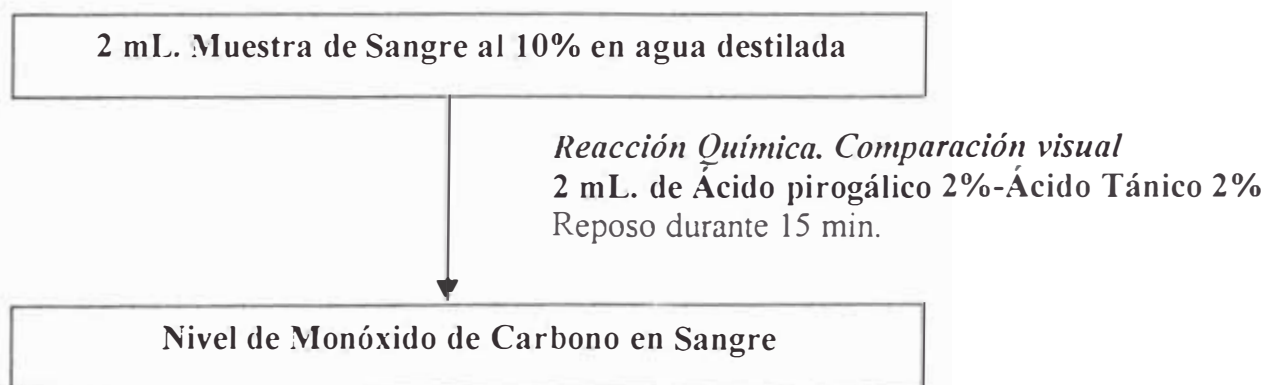


2.2.4 Prueba del Ácido Pirogálico - Ácido Tánico "Método de Sayers-Yant":

Patrón de Calibración Visual



Uso del Patrón

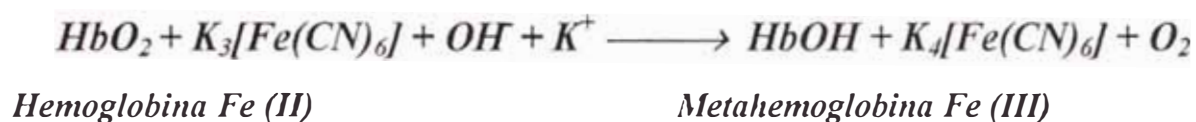


2.3 Determinación de la Hemoglobina “Método de la Metacianohemoglobina”: ^(1,17)

Principio: El *Método de la Metacianohemoglobina (Estándar en Hematología)* utiliza el reactivo de Drabkin formado por ferricianuro de potasio y cianuro de potasio en un medio ligeramente básico para la determinación del contenido de hemoglobina, que se expresa en g de Hb / 100 mL.

La hemoglobina es oxidada por el ferricianuro de potasio formando metahemoglobina y posteriormente se convierte con el cianuro de potasio en metacianohemoglobina (*Curvas Espectrales N°60 al 61*).

Reacción Química:



La lectura de la absorbancia de este compuesto se realiza a la longitud de onda de máxima absorción y es proporcional a la cantidad de metacianohemoglobina formada y se puede determinar la concentración de la hemoglobina inicial (*2.3.2 Procedimiento para la Determinación de Hemoglobina Total en Sangre*).

En el método todas las formas de hemoglobina que normalmente se encuentran, con excepción de la sulfohemoglobina, se convierten cuantitativamente en metacianohemoglobina.

En un adulto normal la concentración de *Hb* es de alrededor 14 g/100 mL, puede disminuir debido a una menor producción o bien aumentar por destrucción (anemias), en otros casos, la concentración de *Hb* puede encontrarse incrementada por insuficiencias respiratorias, exposición a la altura (pilocitemias)⁽¹⁷⁾.

El máximo rango de trabajo del método es hasta los 18 g/100 mL.

Los valores normales de la hemoglobina son:

<i>Valores normales</i>	<i>Hb (g/100 mL)</i>
Nacimiento	14 – 24
3 meses	10,5 – 14,5
Adultos: Sexo masculino	13 - 18
Adultos: Sexo femenino	16

El porcentaje de error del método no sobrepasa el 2%⁽¹⁾.

Se utilizó un estándar de hemoglobina que contiene preservantes (*AB Chimica Laboratorios S.A.*). El método sigue los procedimientos del Comité Internacional para Estandarización de Hematología.

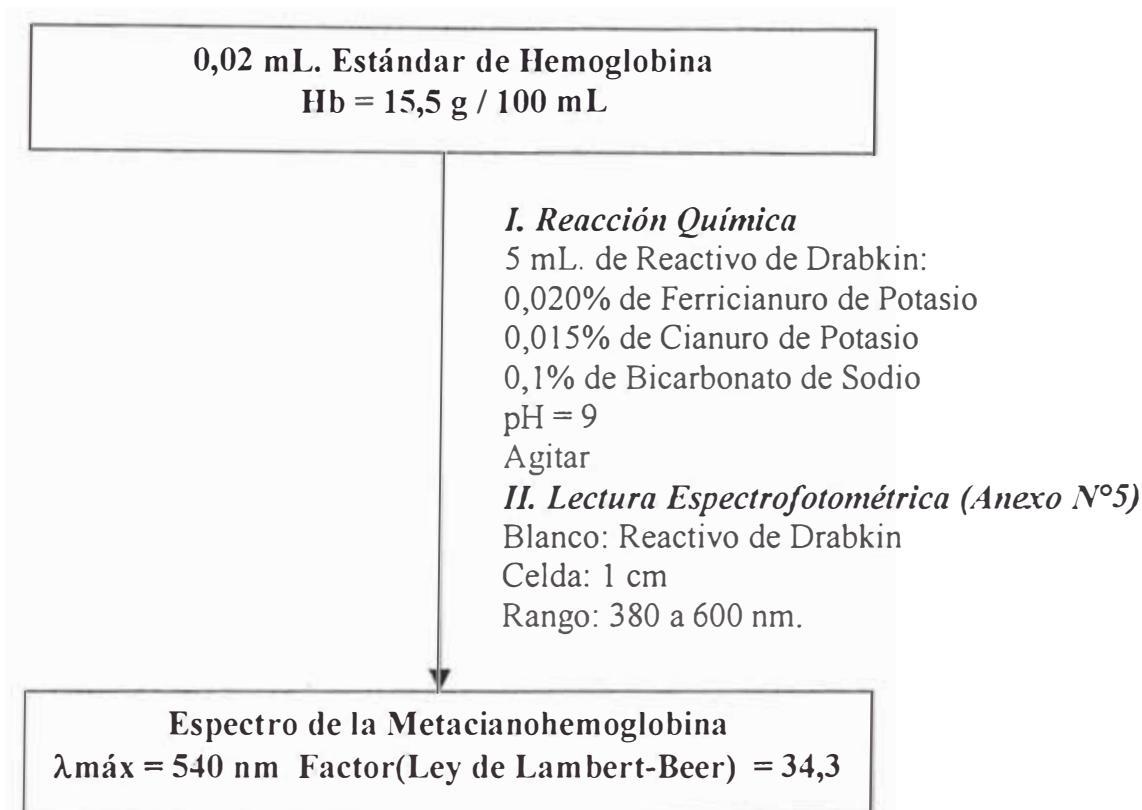
El volumen de sangre se realiza mediante una pipeta graduada llamada “Pipeta Sahli”. El reactivo de Drabkin se preparó en el laboratorio, el tiempo de duración es de 6 meses y se guarda en frasco ámbar cubierto por papel aluminio.

La metacianohemoglobina es estable durante 24 horas.

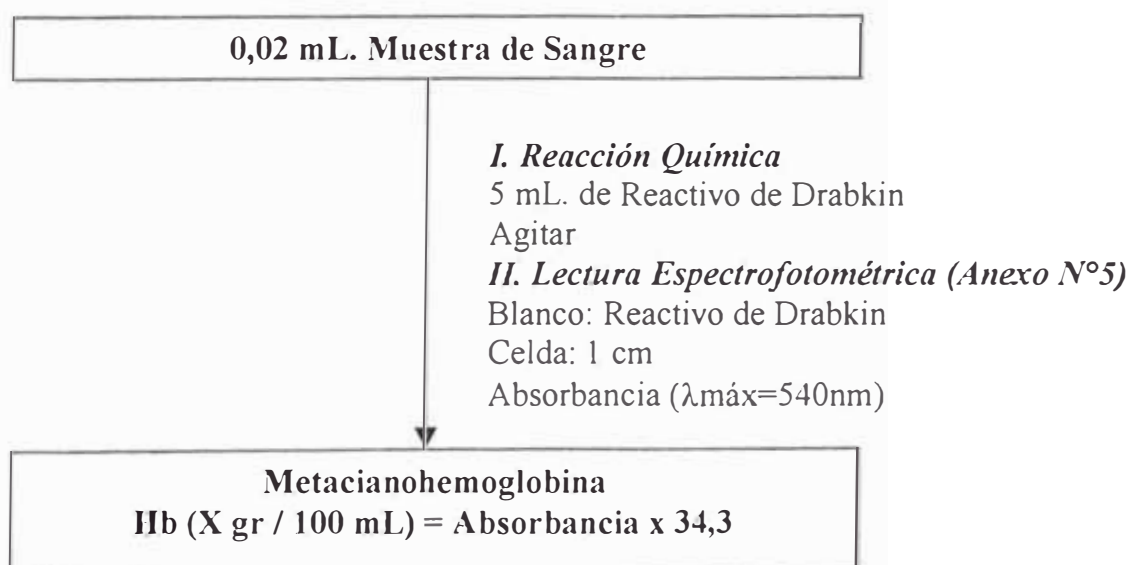
Relacionamos experimentalmente el Método de la Metacianohemoglobina con el Método Espectrofotométrico calculando la altura óptica máxima (**ho**) (2.1.2.2 *Carboxihemoglobina Saturada HbCO*) a partir de la medida de hemoglobina (**Hb:g/100mL**) (2.3.2 *Procedimiento para la Determinación de Hemoglobina Total en Sangre*). Esto proporciona una modificación al método propuesto y fija un rango de aplicación experimental (3.3.4 *Dependencia experimental de la altura óptica máxima de la HbCO con la concentración de la Hb*).

Procedimiento Experimental

2.3.1 Procedimiento de Calibración del Método:



2.3.2 Procedimiento para la Determinación de Hemoglobina Total en Sangre:



2.4 Evaluación del Nivel de HbCO en no fumadores y fumadores de la Ciudad de Lima:

Principio: Se aplica el *Método Espectrofotométrico modificado* a una muestra poblacional de no fumadores y fumadores de Lima según los datos estadísticos proporcionados por CEDRO⁽⁶⁾ (*Anexo N°8*).

La muestra de sangre extraída de los fumadores se realizó inmediatamente después de consumir el último cigarrillo con un margen de 5 minutos. Se procuró que los fumadores se llevaran hasta los pulmones el humo durante la inspiración.

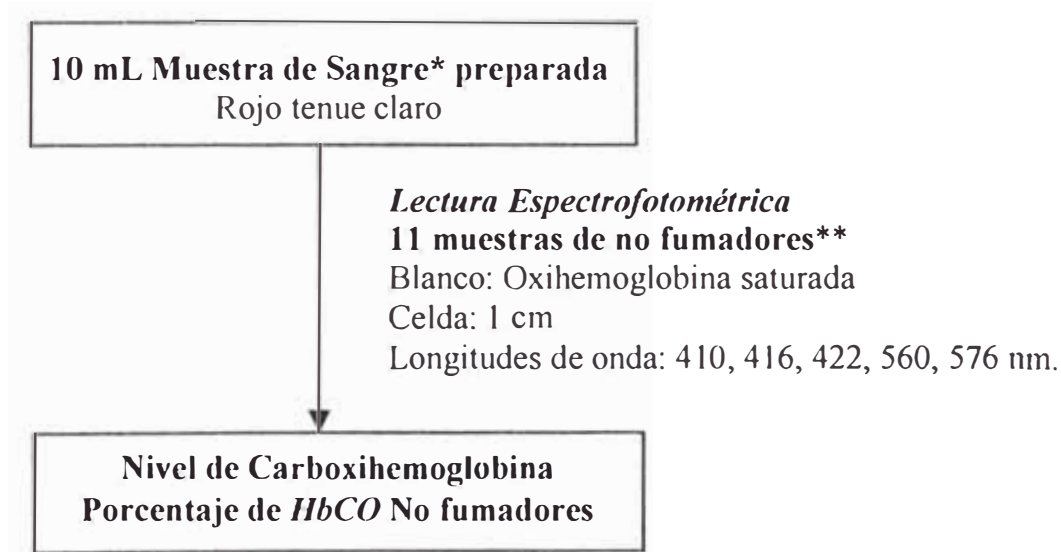
Para el análisis del nivel de carboxihemoglobina en los fumadores se utilizó como un tiempo máximo de análisis de 1 hora en las 30 muestras.

Se realizó una encuesta a los fumadores para determinar variables que puedan influir en el nivel de carboxihemoglobina.

Para muestras de no fumadores se mide el porcentaje de HbCO endógeno y para fumadores se mide el porcentaje de HbCO endógeno más el atribuido a la cantidad de cigarrillos fumados.

Procedimiento Experimental:

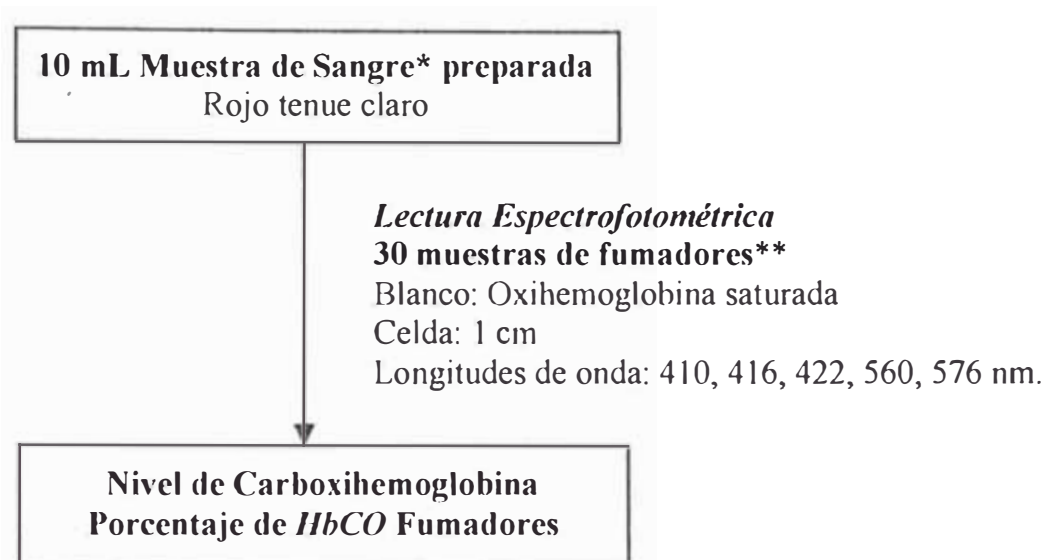
2.4.1 Nivel de Carboxihemoglobina en no fumadores:



*Se determina la hemoglobina de la muestra de sangre por el Método de la Metacianohemoglobina.

** Porcentaje equivalente a la Estadística de CEDRO (Centro de Información y Educación para la prevención del abuso de drogas) de la Ciudad de Lima de 1995.

2.4.2 Nivel de Carboxihemoglobina en fumadores:



*Se determina la hemoglobina de la muestra de sangre por el Método de la Metacianohemoglobina.

**Porcentaje equivalente a la Estadística de CEDRO de la Ciudad de Lima de 1995.

2.4.3 Encuesta realizada a los fumadores:

ENCUESTA

1. Nombre:

.....

2. Sexo: Masculino Femenino

3. Edad:

4. Lugar de Residencia:

.....

5. Grado de Instrucción:

Ninguno Primaria Secundaria Superior

6. Ocupación y Lugar de Trabajo (Distrito):

Profesionales

Empleados

Militares y Policías

Oficios menores

Comerciantes menores

Trabajador de servicios

Vendedor informal/Ambulante

Trabajador/Agrícola/Ganadero/Maderero/Pescador/Minero.....

Población no económicamente activa

7. Contextura:

Talla (cm) Peso (Kg) Caja Torácica (cm)

8. ¿Cuántos cigarrillos Ud. fuma al día?

.....

9. ¿Cuál es la marca que prefiere o usualmente consume?

.....

10. ¿Cuales son las dolencias frecuentes que tiene Ud.?

Bronquiales o Enfermedades respiratorias

Cardiovasculares (ataques al corazón, aterosclerosis)

Envejecimiento y trastornos menstruales

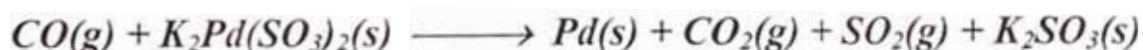
Sistema nervioso, cansancio o bajo rendimiento físico

2.5 Determinación por Tubos Colorimétricos de la concentración de CO (ppm): ^(2.4,33)

Principio: Los tubos de detección colorimétrica son sistemas de toma de muestra “in situ”. Cada tubo contiene una cantidad determinada de reactivo adsorbido sobre sílica, alúmina u otro adsorbente. El tubo tiene un diámetro interno constante y está herméticamente cerrado por ambos extremos. Se rompen sus extremos y se conecta a la bomba pistón. Se aspira el volumen de aire deseado (número de emboladas). El reactivo reacciona con el gas, generando una coloración determinada. La longitud coloreada es proporcional a la cantidad de gas estudiado. Se determina la concentración de CO por lectura directa en el tubo que tiene una escala preestablecida por el fabricante.

El tubo detector para CO No. 1L (Anexo N°7) proporciona un rápido análisis cuantitativo de la concentración de Monóxido de Carbono en aire con una mínima exactitud de + 25% en 1,2 y 5 tiempos TLV (Threshold Limit Value-Time Weighted Average por American Conference of Governmental Industrial Hygienists para CO es de 25 ppm. durante 7-8 horas). y + 35% en 1/2 TLV utilizando la bomba de muestreo de gases por múltiples emboladas.

Reacción Química:



La técnica de los tubos colorimétricos (medición in situ) se emplea con la intención de tener una relación referencial entre la concentración de CO ambiental y el nivel de carboxihemoglobina.

Se mide mediante un sistema de simulación el CO inspirado directamente del humo de cigarrillos (Anexo N°9) y se mide el CO de un número de cigarrillos en un ambiente interior a una distancia del foco emisor: humo de cigarrillos.

Medición directa del CO del humo de cigarrillos (Anexo N°9):

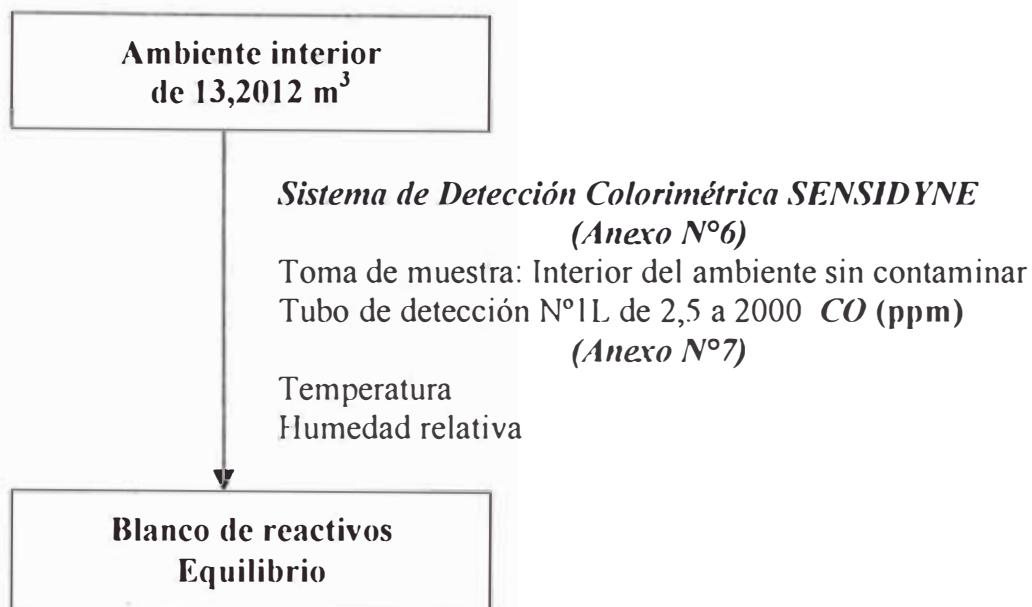
Medición de CO en un ambiente interior expuesto al humo de cigarrillos:

La toma de muestra se realiza en un ambiente cerrado de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en el Área de Química de 13,2012 m³ a 30 cm de altura y 50 cm de largo del humo del cigarrillo *Winston light*. Primero se muestrea el aire en equilibrio con el humo de 2 cigarrillos (al momento en que se consumen los cigarrillos), luego con 4 cigarrillos, 6 cigarrillos y por último se mide después de media hora del último cigarrillo.

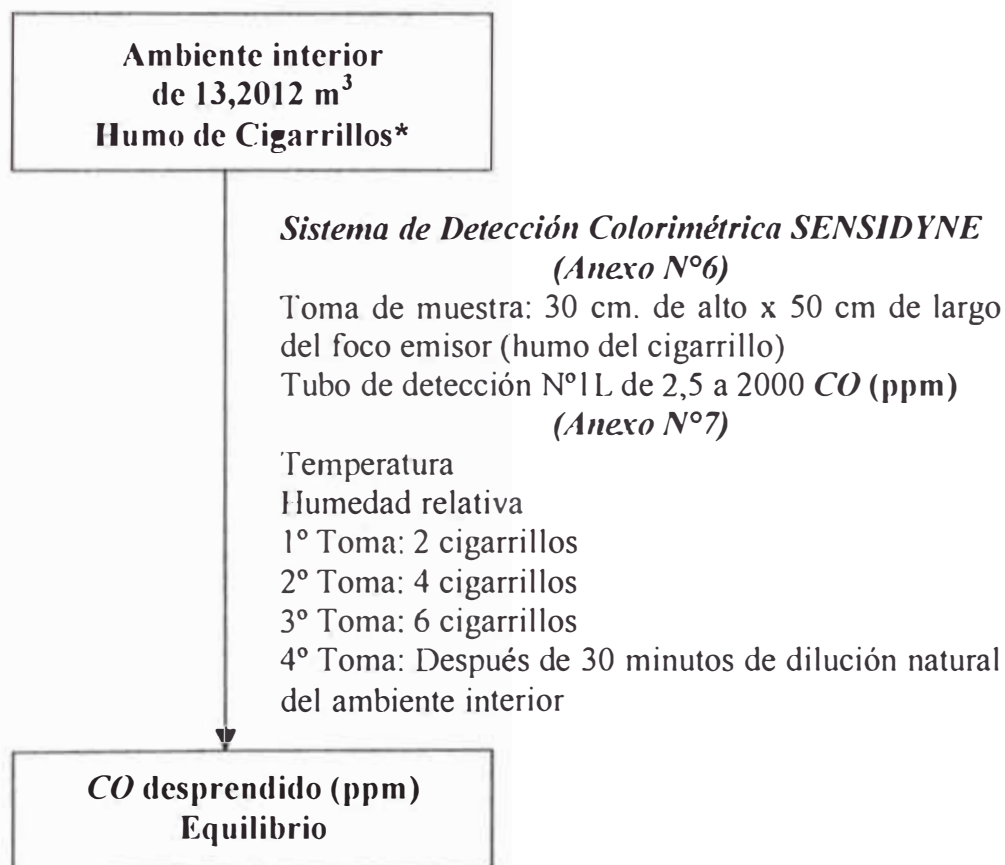
Procedimiento Experimental:

2.5.1. Medición de CO en un ambiente interior expuesto al humo de cigarrillos:

2.5.1.1. Blanco de reactivos



2.5.1.2. Toma de muestra en el ambiente contaminado con CO



* Se escogió la marca de cigarrillos más usada según la encuesta llevada a cabo.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

3.1 Método Espectrofotométrico de medición del CO sanguíneo como Carboxihemoglobina (HbCO): ^(26,27)

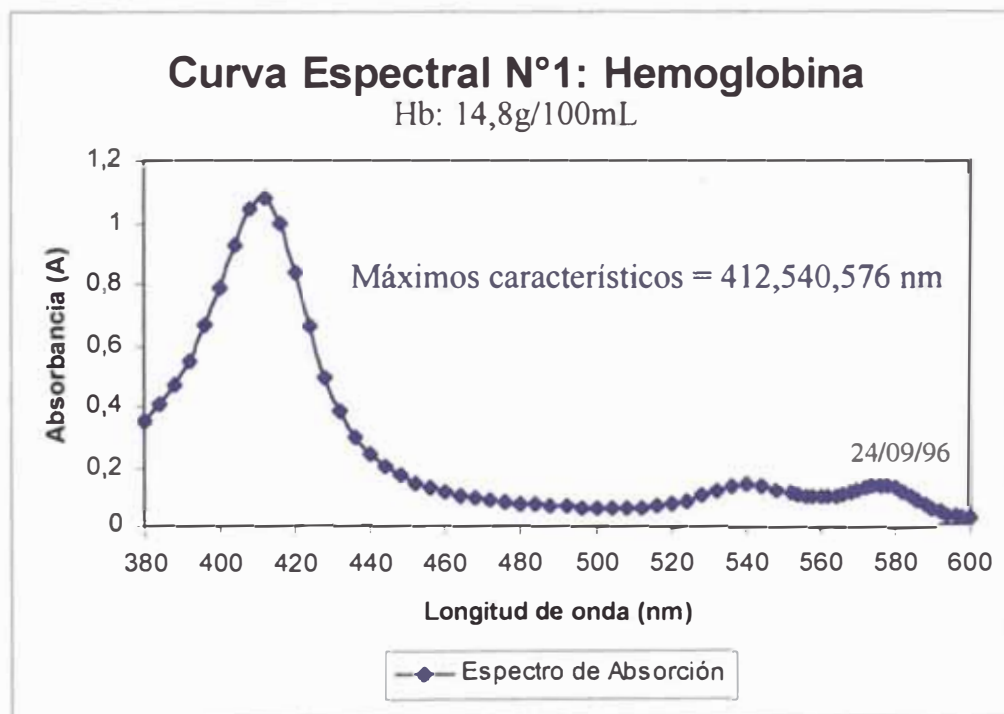
3.1.1 Estudio de los Espectros de Absorción:

Se presentan los espectros obtenidos de los derivados de la hemoglobina.

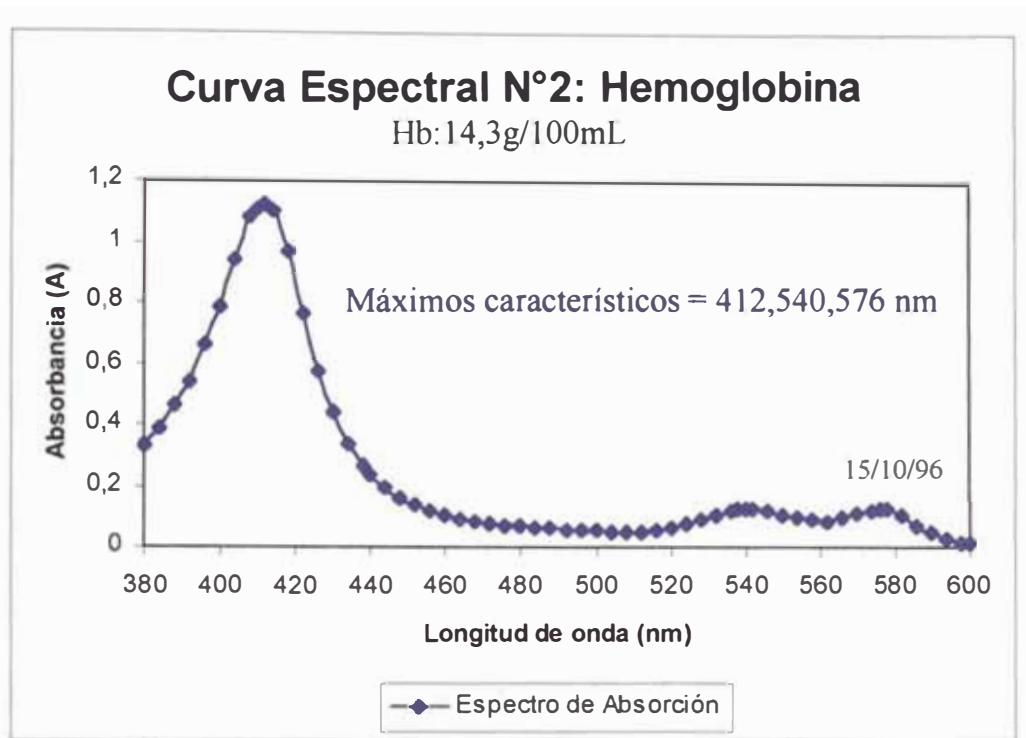
Condiciones Experimentales:

Espectro: Hemoglobina
Muestra: Sangre diluida. S.I.A. 0,1%
Blanco: S.I.A
Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)
Operador: MLDA

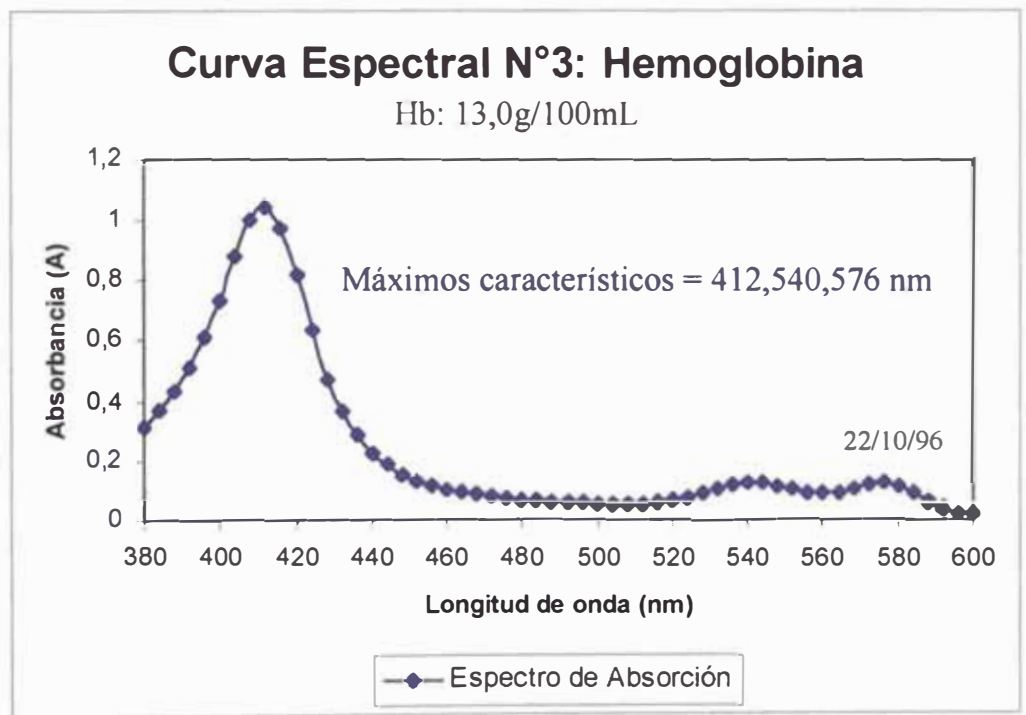
Curva Espectral N°1: Hemoglobina



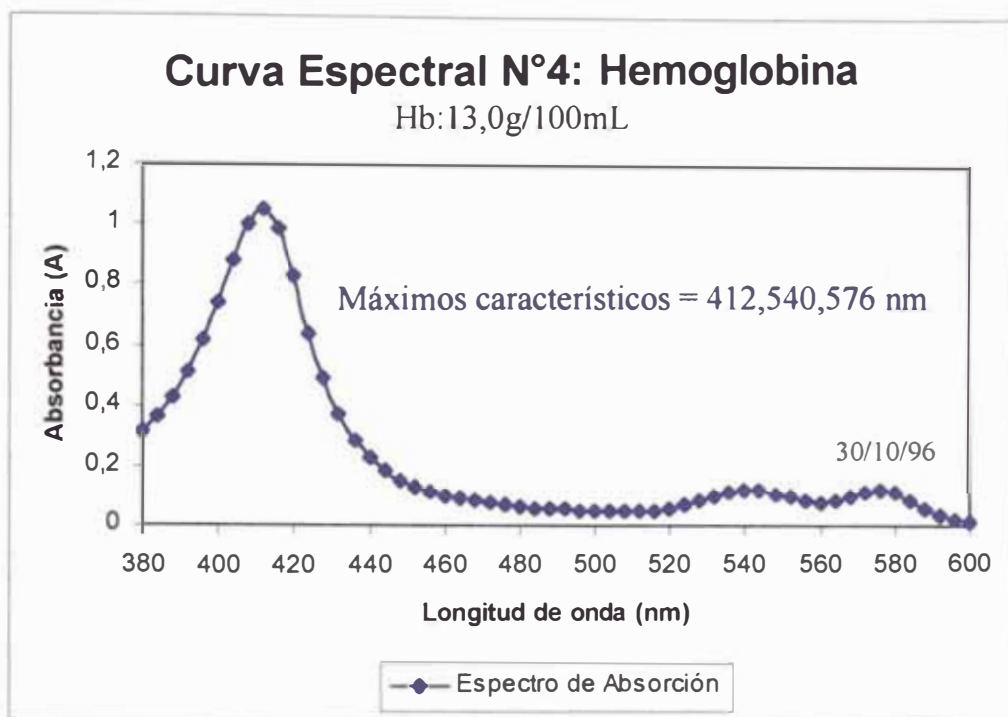
Curva Espectral N°2: Hemoglobina



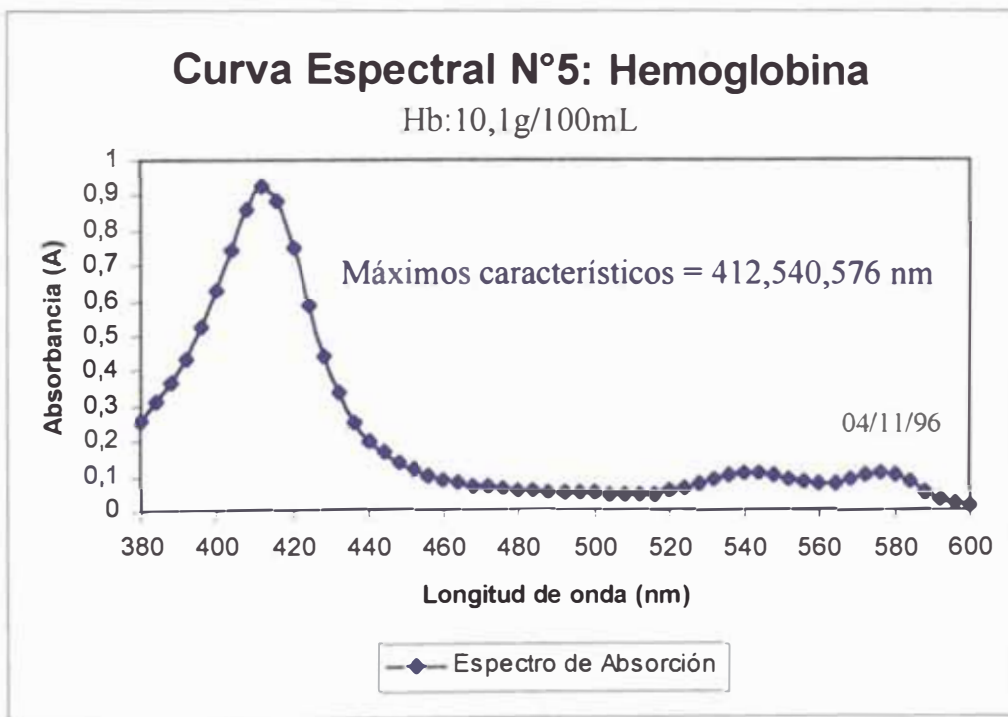
Curva Espectral N°3: Hemoglobina



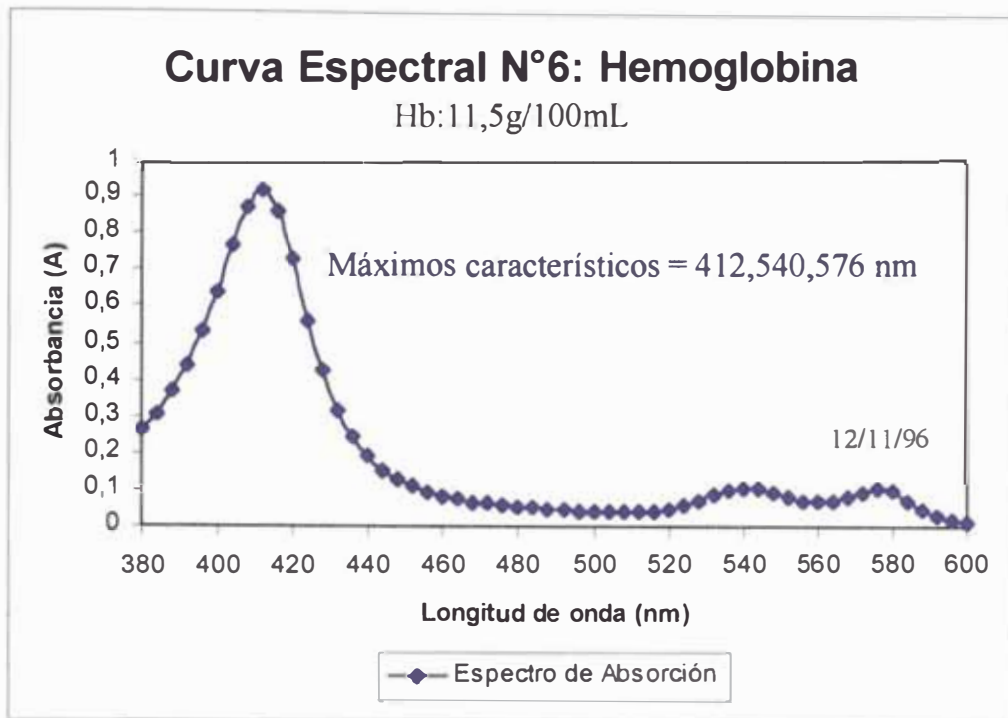
Curva Espectral N°4: Hemoglobina



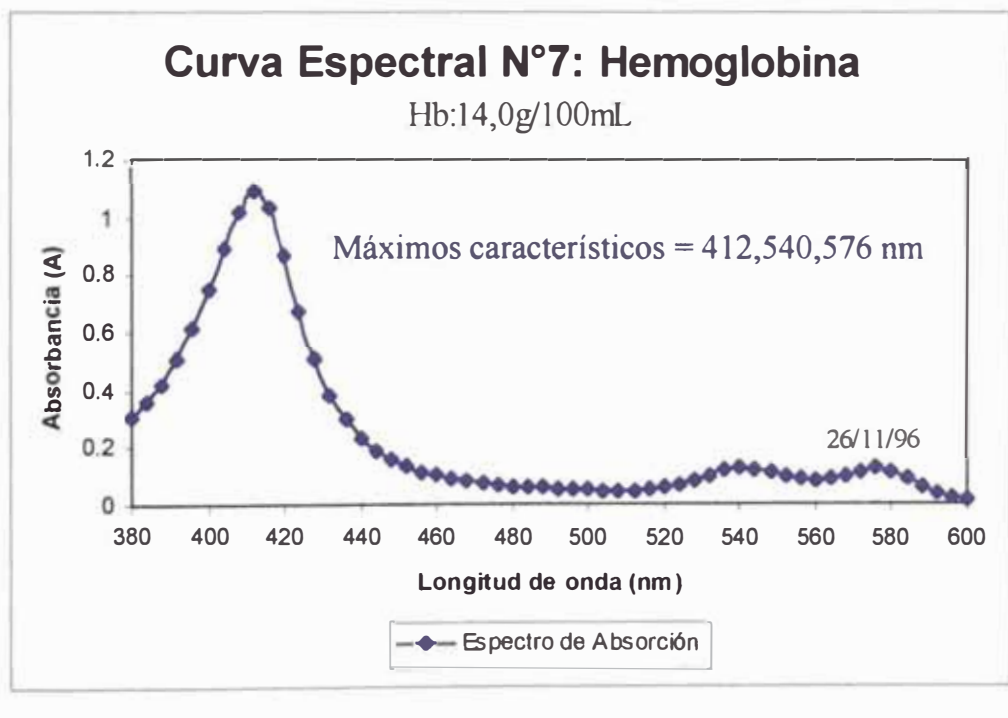
Curva Espectral N°5: Hemoglobina



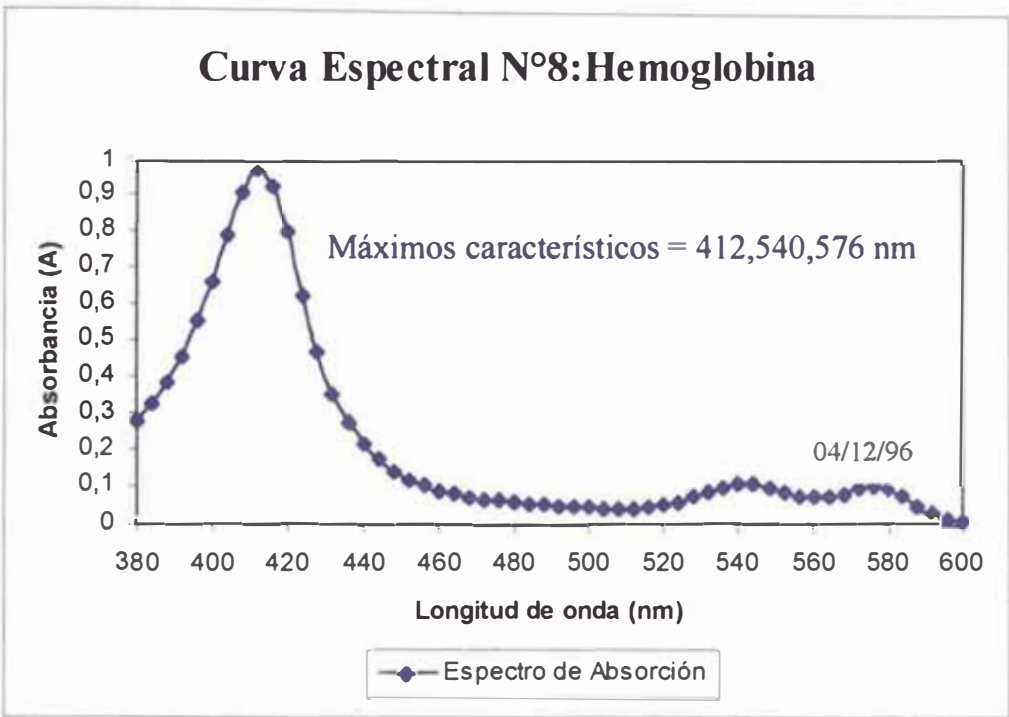
Curva Espectral N°6: Hemoglobina



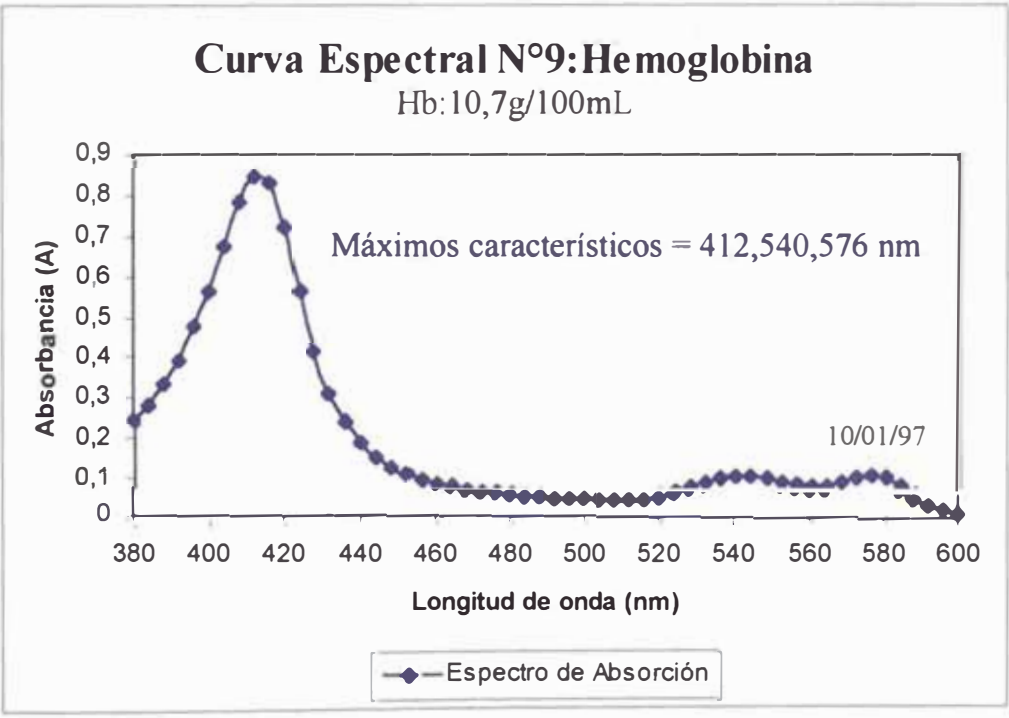
Curva Espectral N°7: Hemoglobina



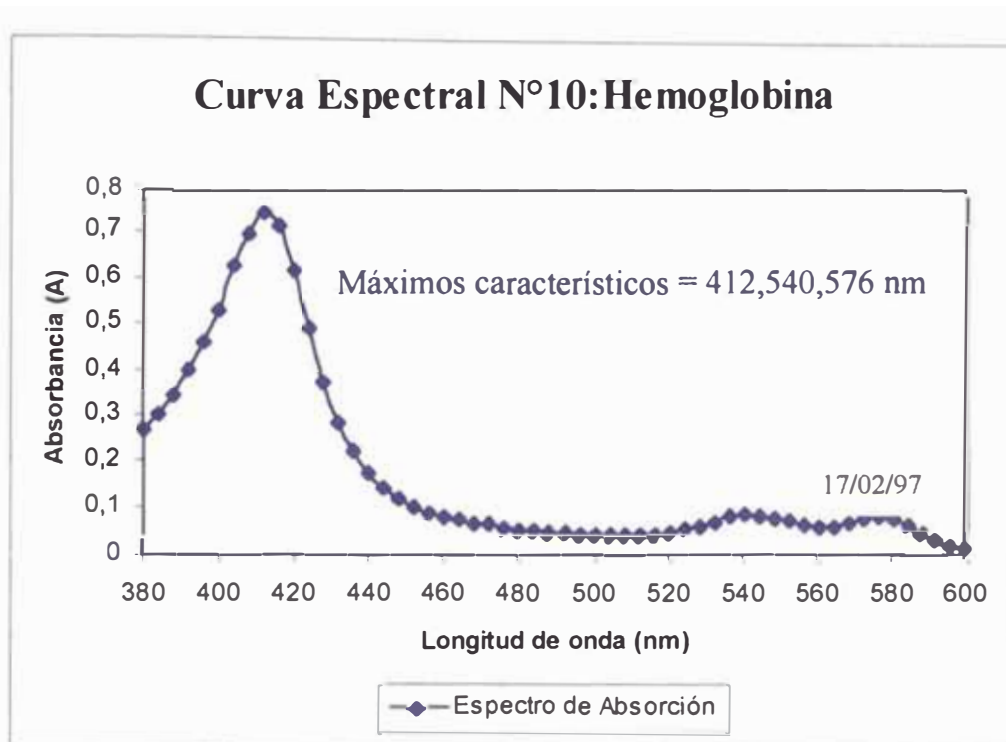
Curva Espectral N°8: Hemoglobina



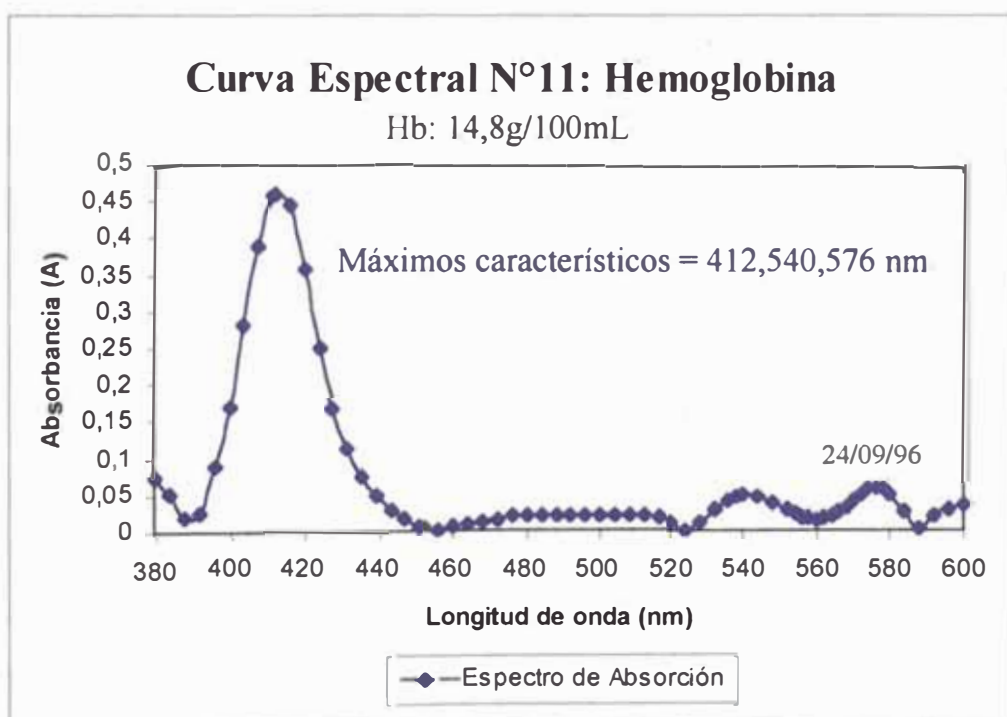
Curva Espectral N°9: Hemoglobina



Curva Espectral N°10: Hemoglobina



Curva Espectral N°11: Hemoglobina



Condiciones Experimentales:

Espectro: Hemoglobina

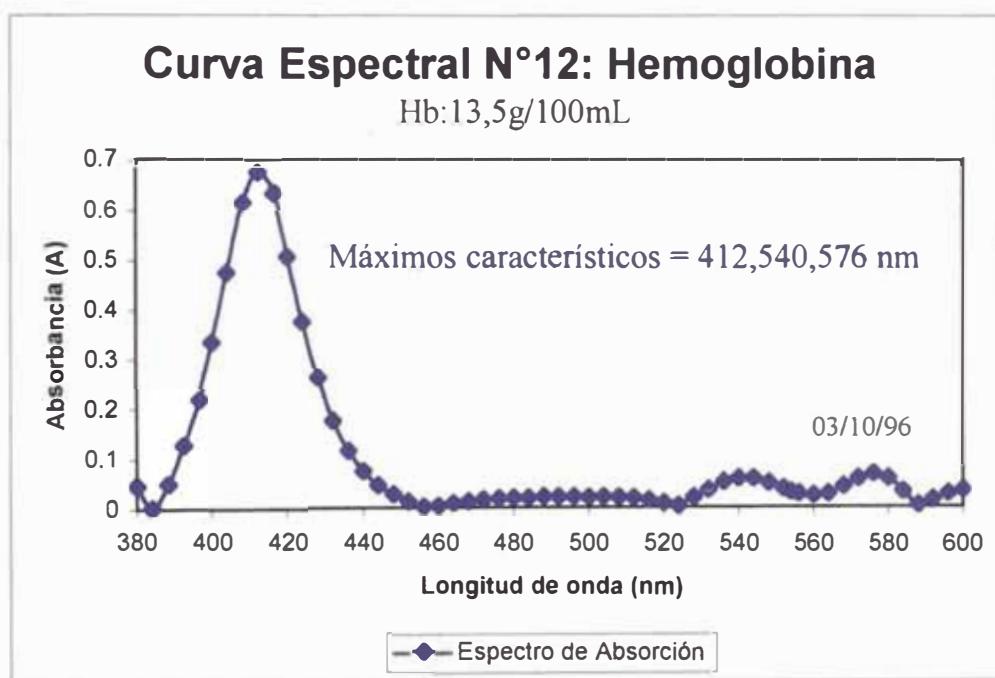
Muestra: Sangre diluída S.I.A. 0,1%

Blanco: Oxihemoglobina saturada

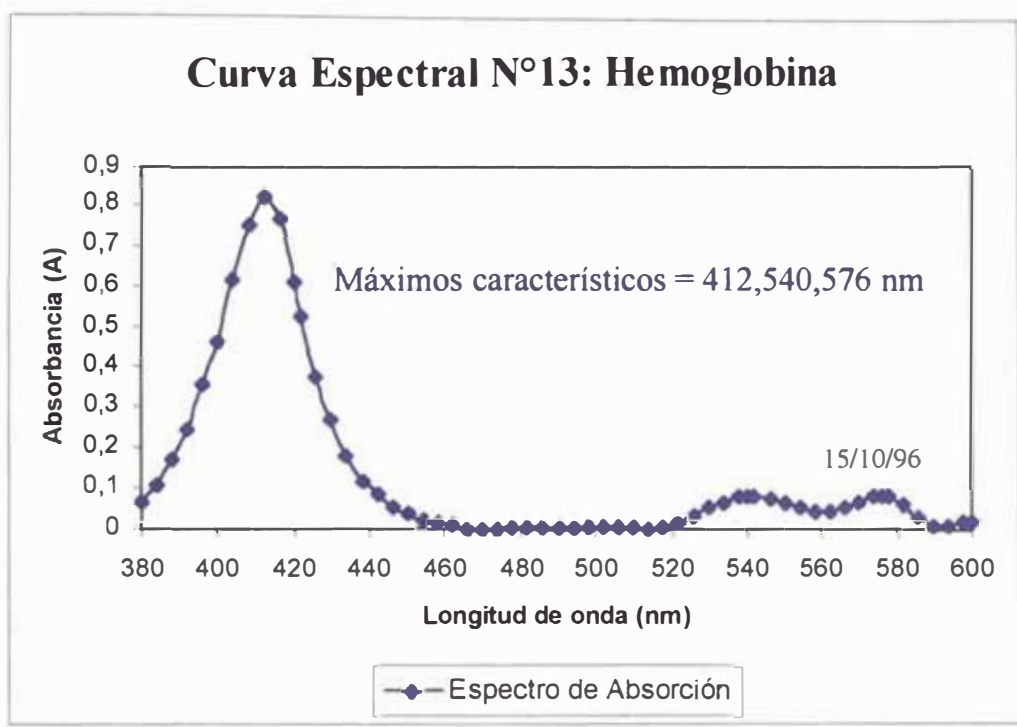
Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)

Operador: MLDA

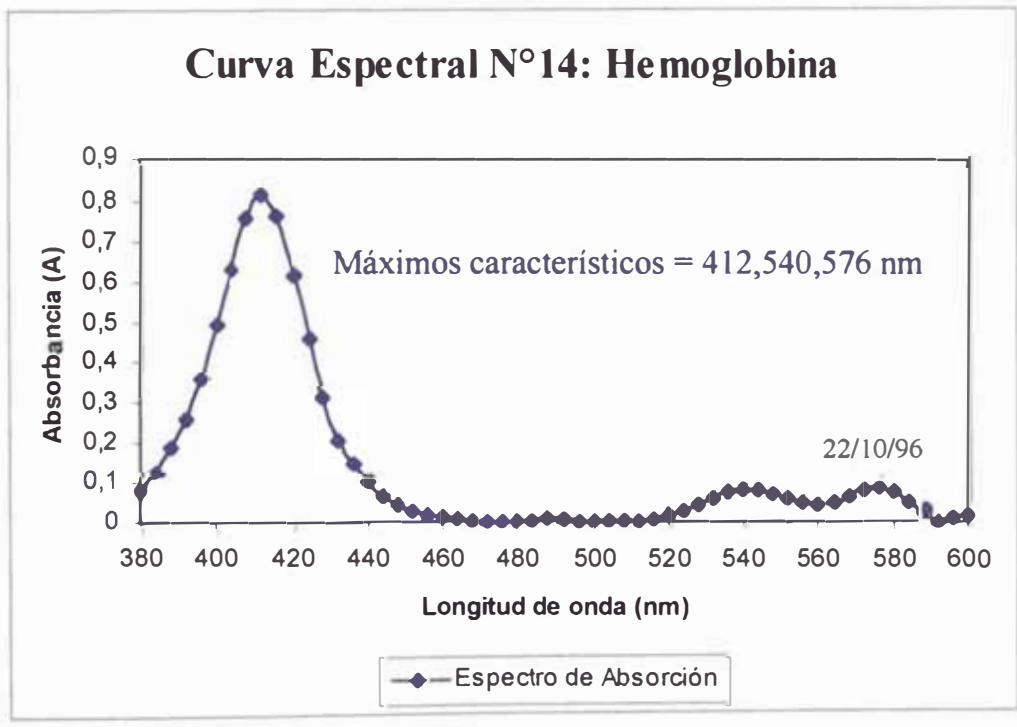
Curva Espectral N°12: Hemoglobina



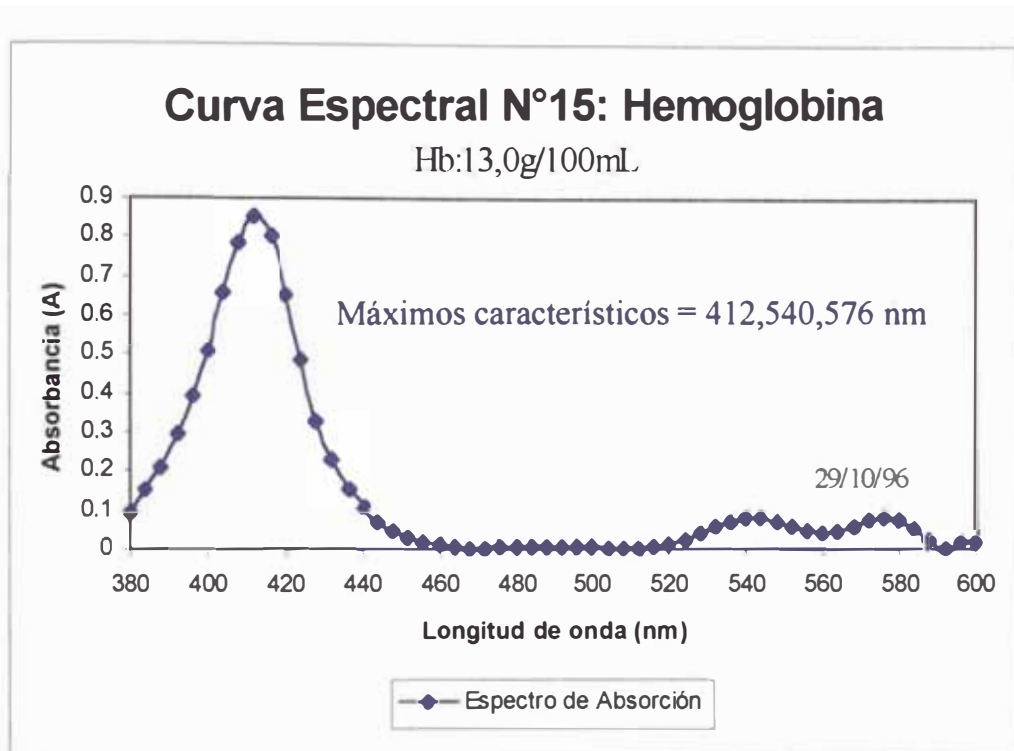
Curva Espectral N°13: Hemoglobina



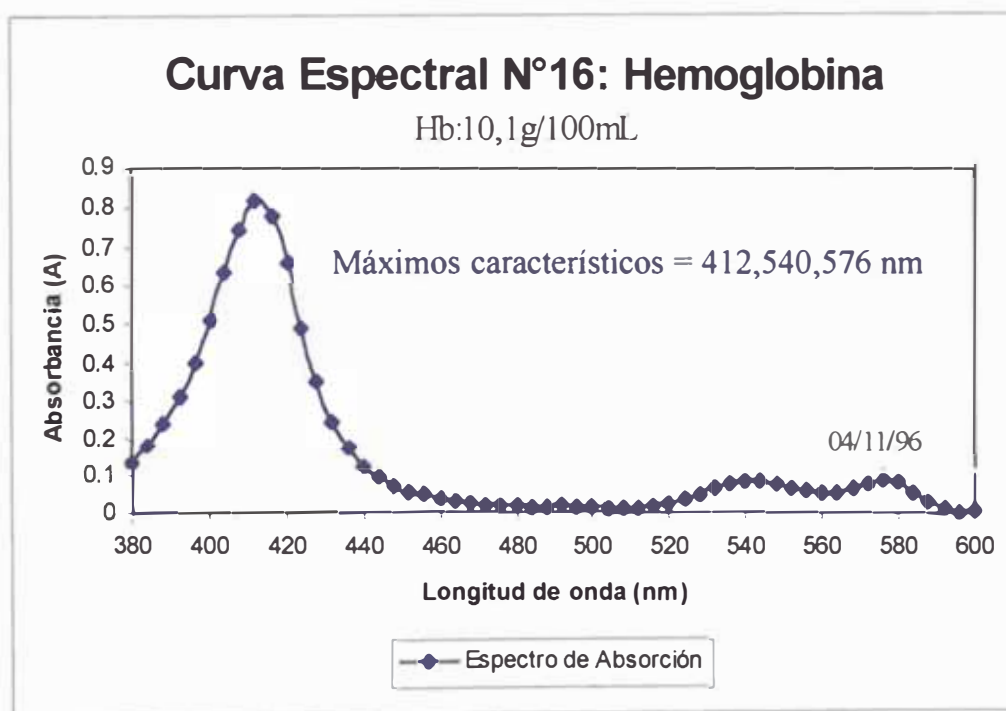
Curva Espectral N°14: Hemoglobina



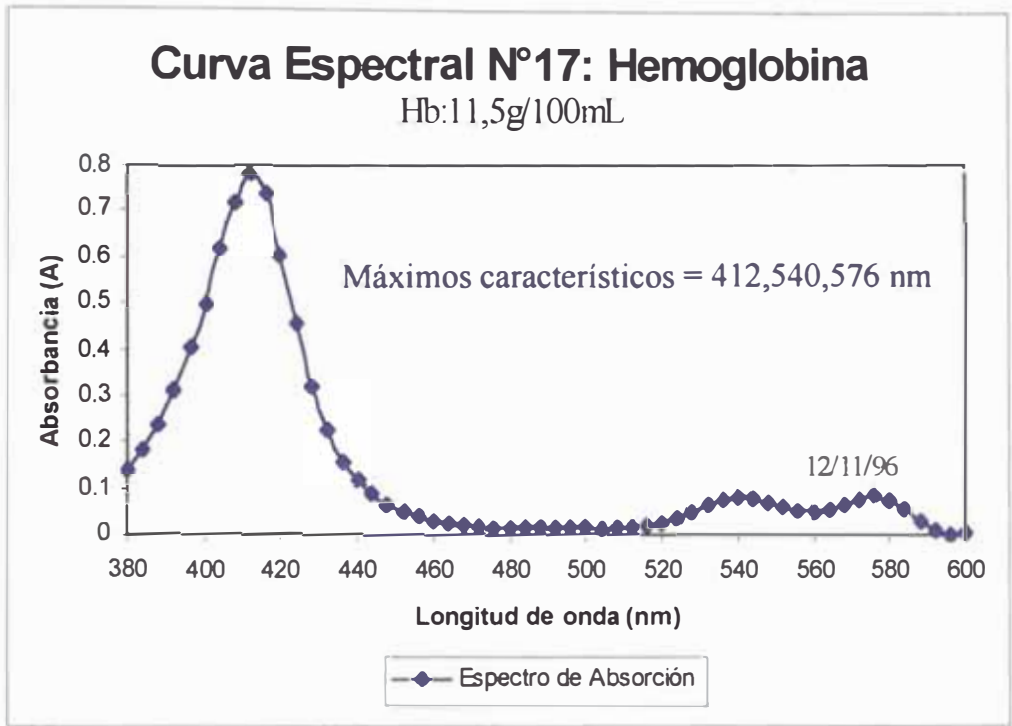
Curva Espectral N°15: Hemoglobina



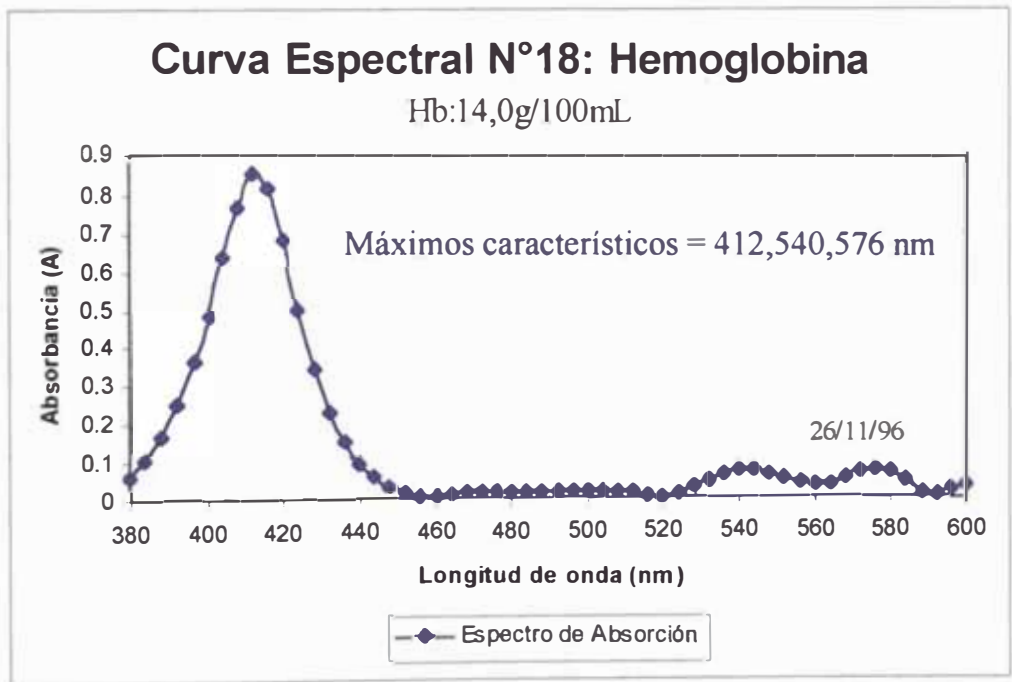
Curva Espectral N°16: Hemoglobina



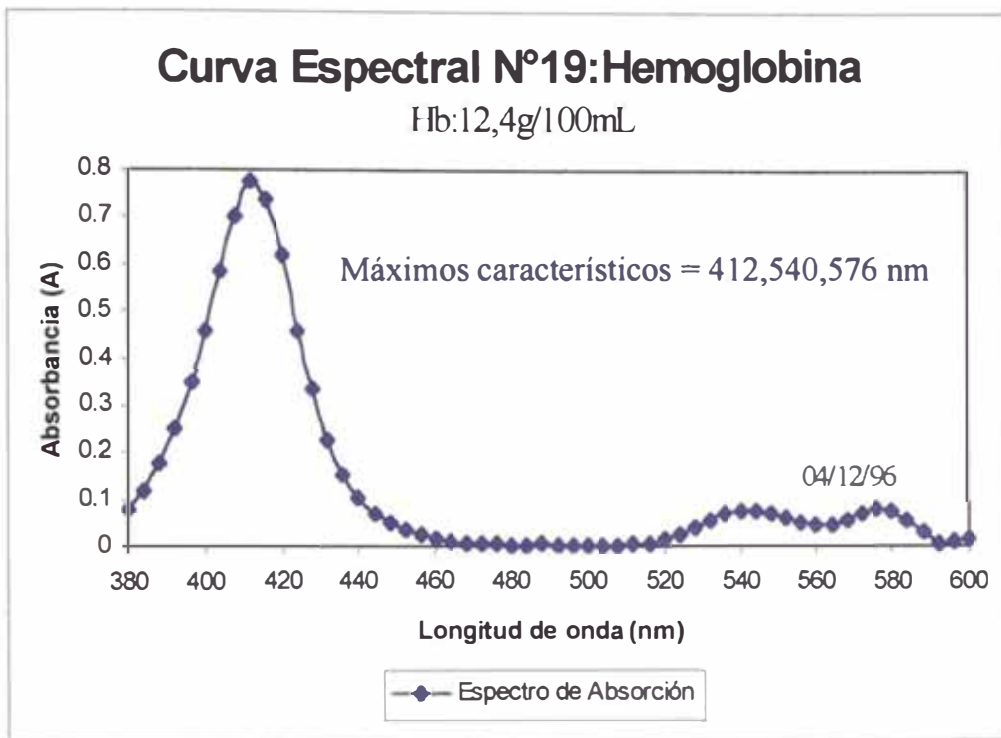
Curva Espectral N°17: Hemoglobina



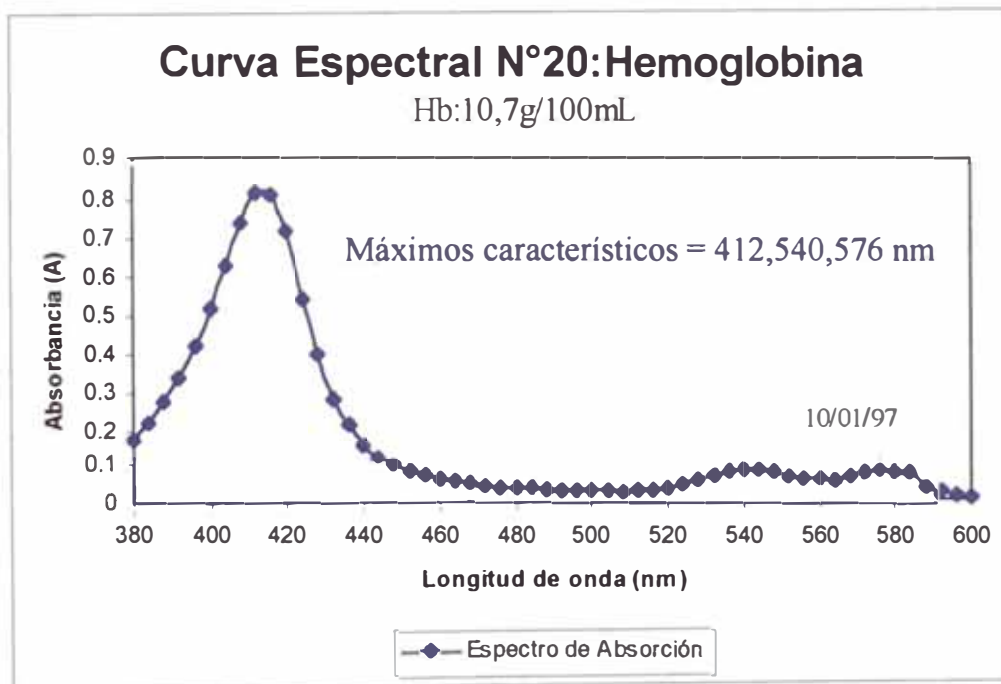
Curva Espectral N°18: Hemoglobina



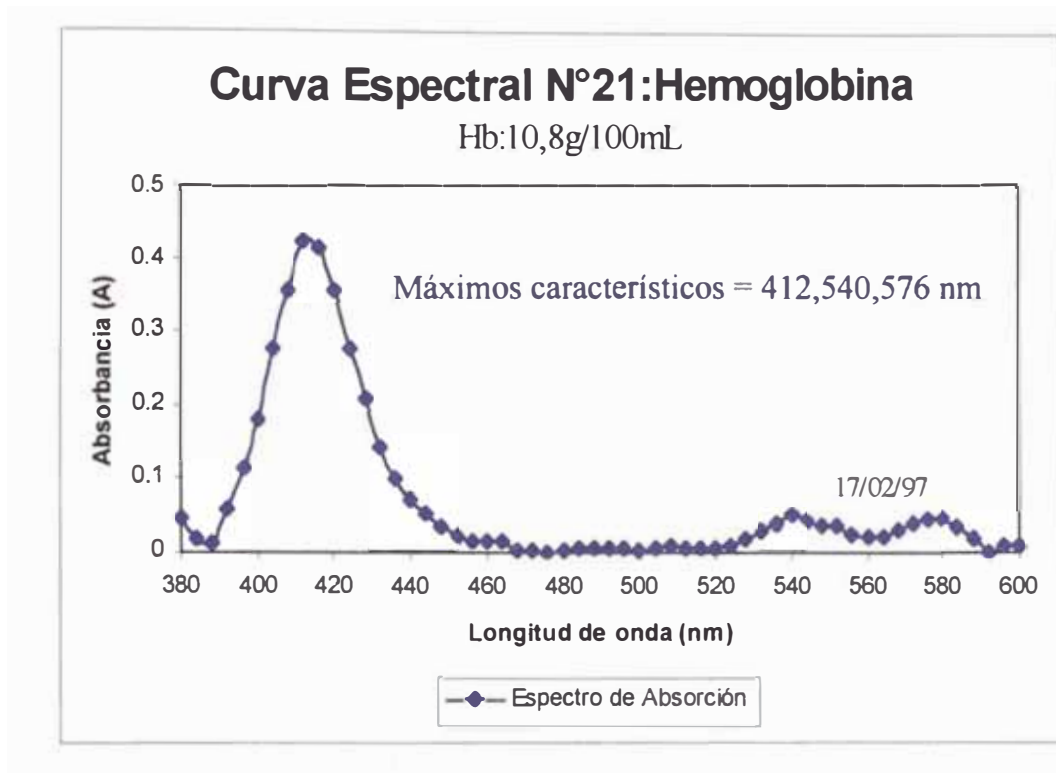
Curva Espectral N°19: Hemoglobina



Curva Espectral N°20: Hemoglobina



Curva Espectral N°21: Hemoglobina



Condiciones Experimentales:

Espectro: Oxihemoglobina saturada

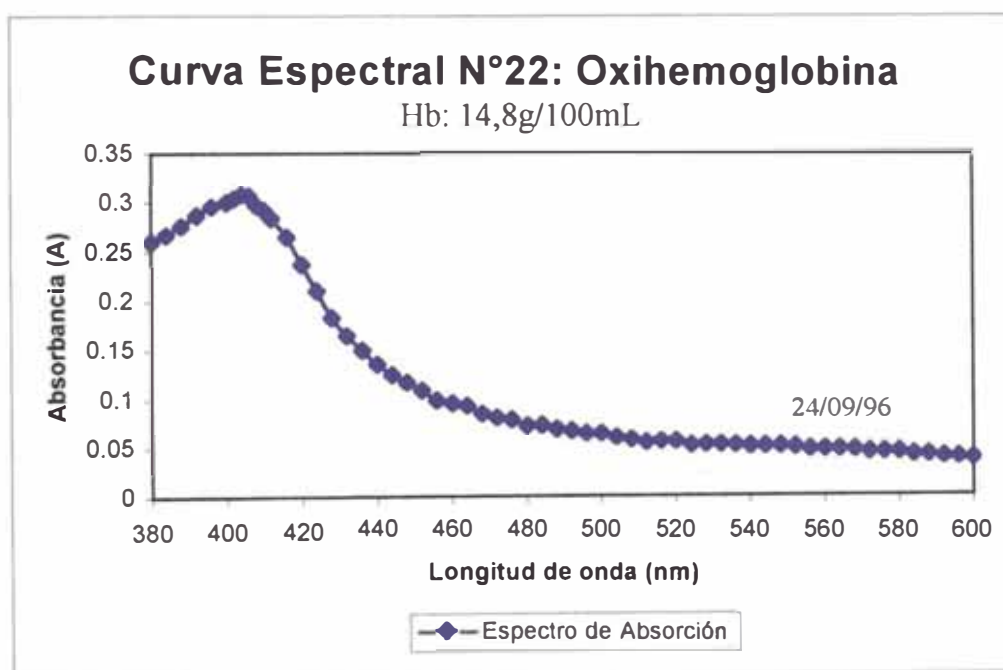
Muestra: Sangre diluída S.I.A. 0,1% saturada con O_2

Blanco: S.I.A

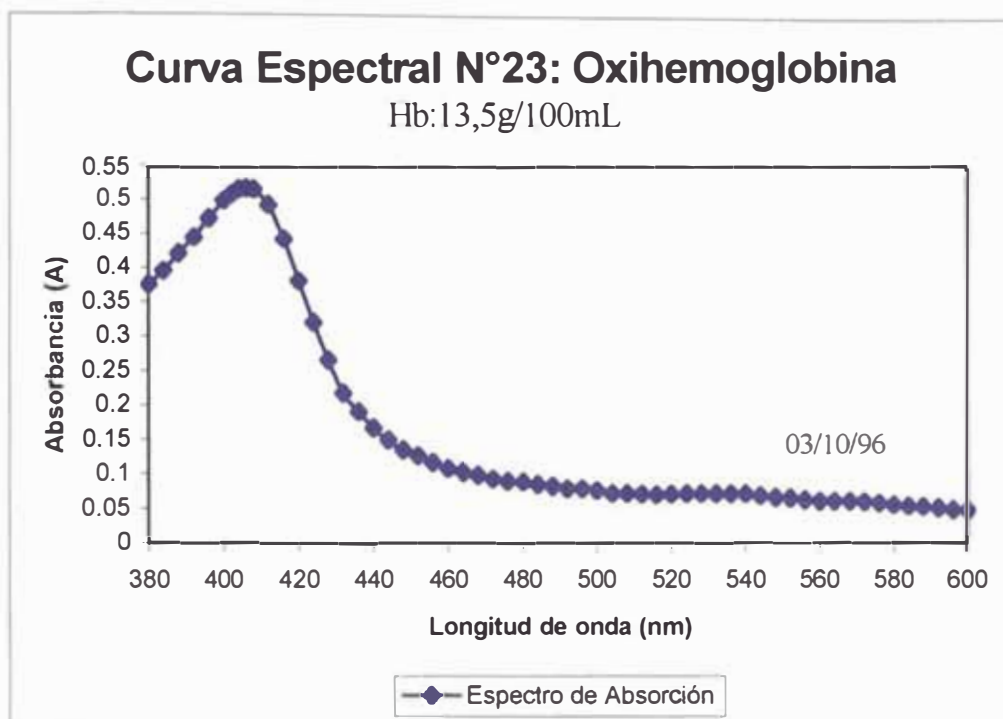
Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)

Operador: MLDA

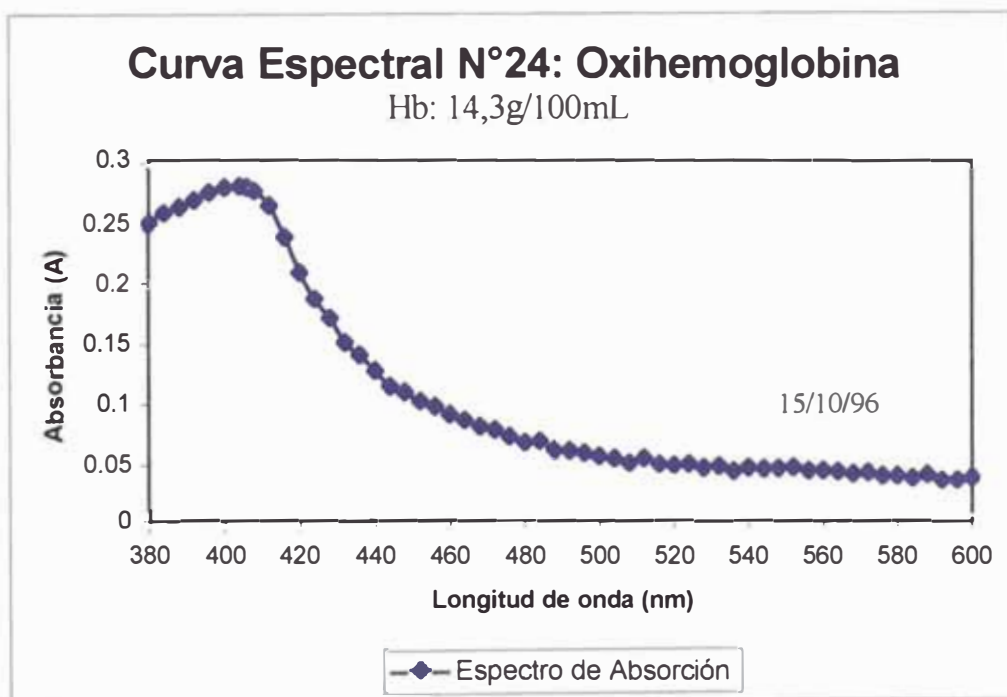
Curva Espectral N°22: Oxihemoglobina saturada



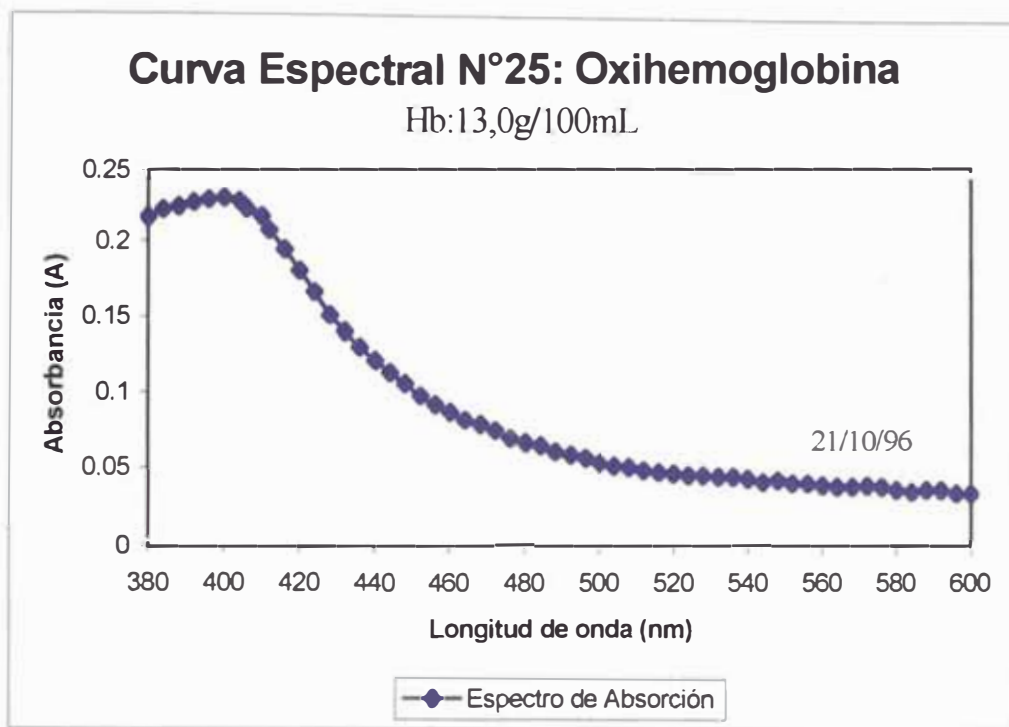
Curva Espectral N°23: Oxihemoglobina saturada



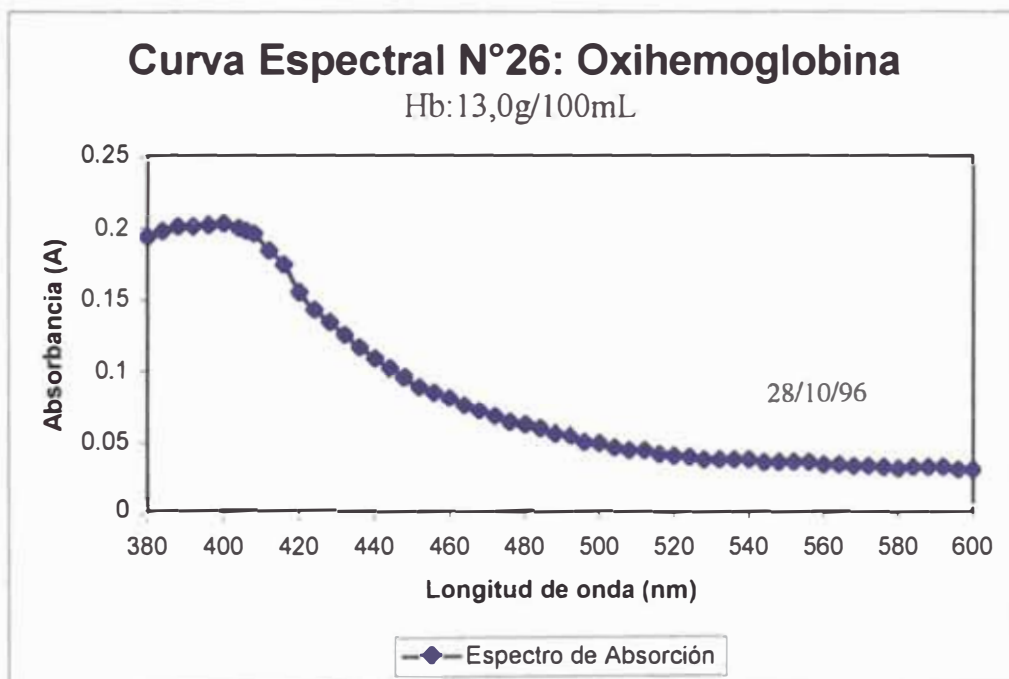
Curva Espectral N°24: Oxihemoglobina saturada



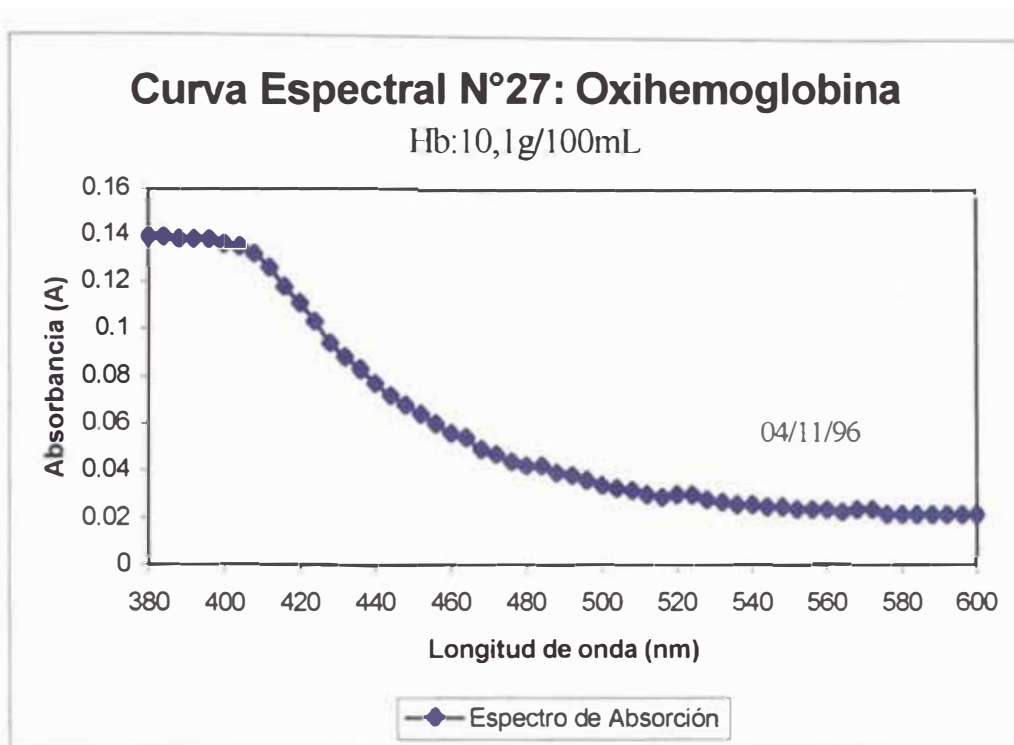
Curva Espectral N°25: Oxihemoglobina saturada



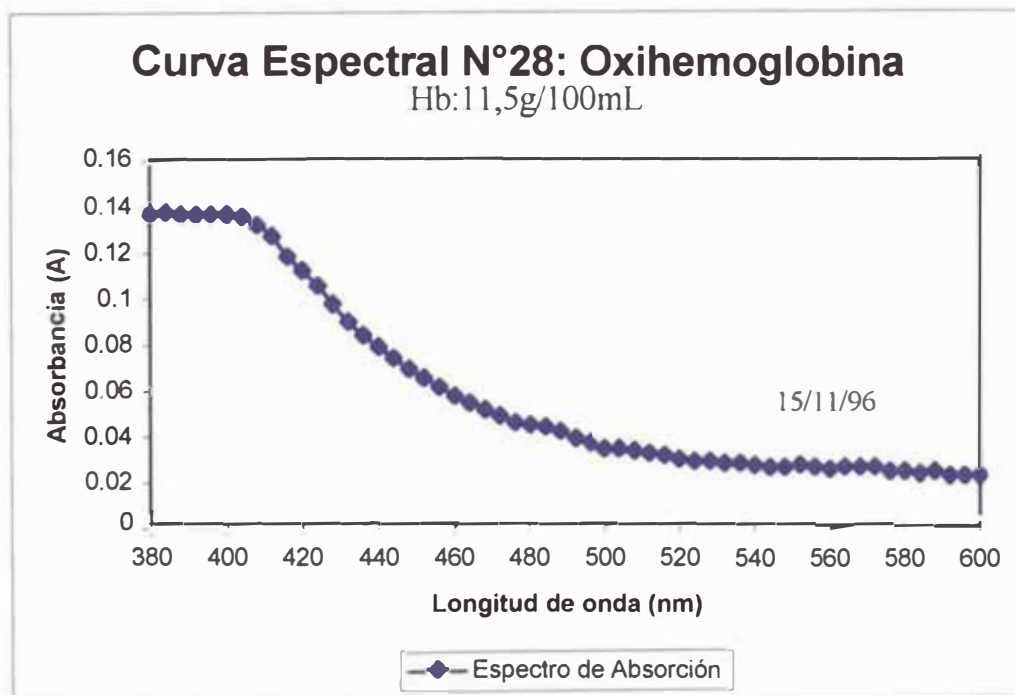
Curva Espectral N°26: Oxihemoglobina saturada



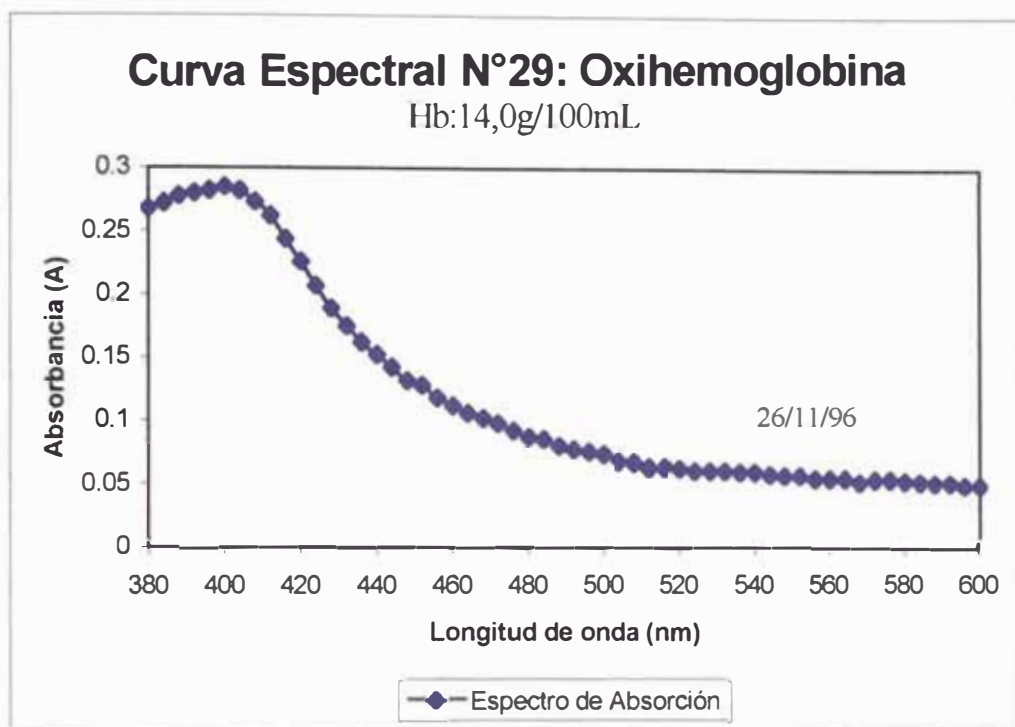
Curva Espectral N°27: Oxihemoglobina saturada



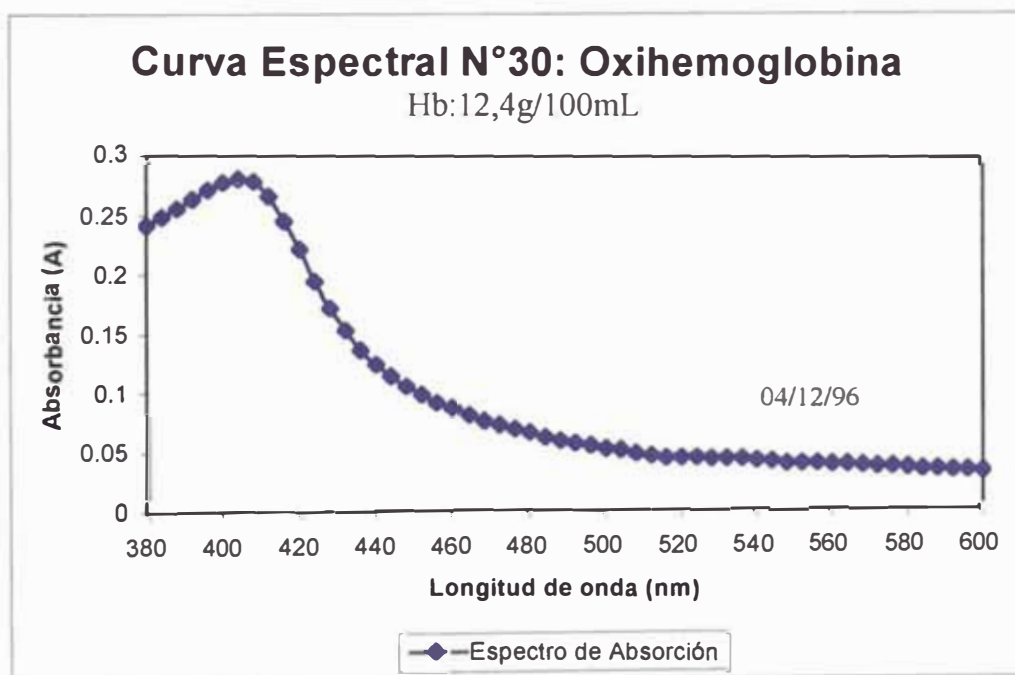
Curva Espectral N°28: Oxihemoglobina saturada



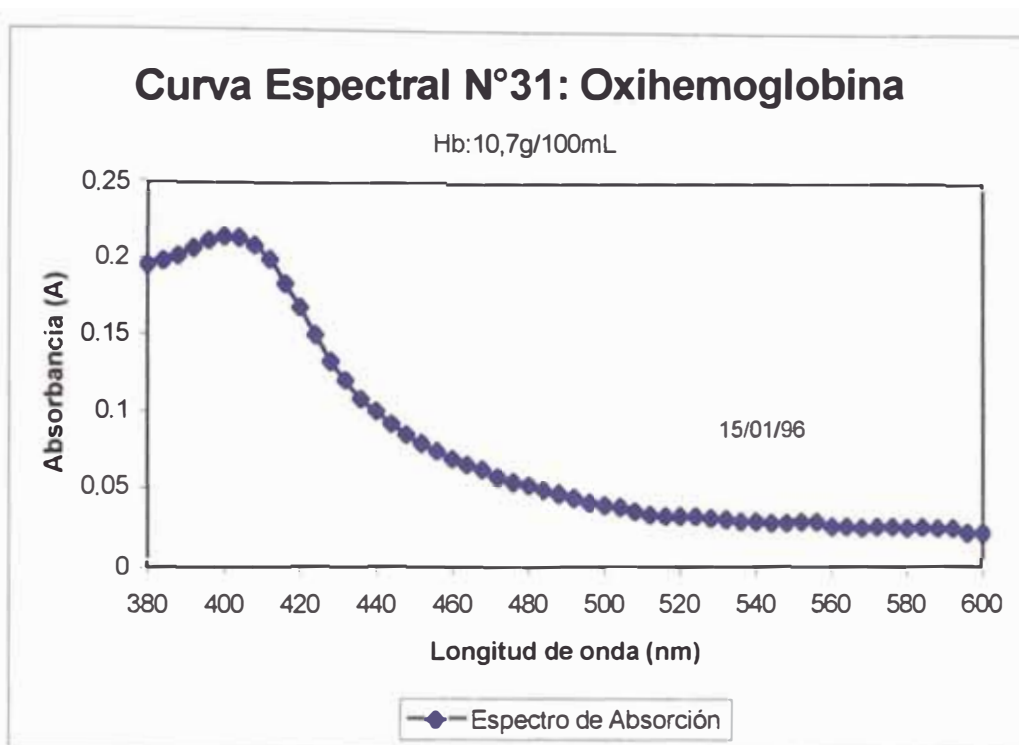
Curva Espectral N°29: Oxihemoglobina saturada



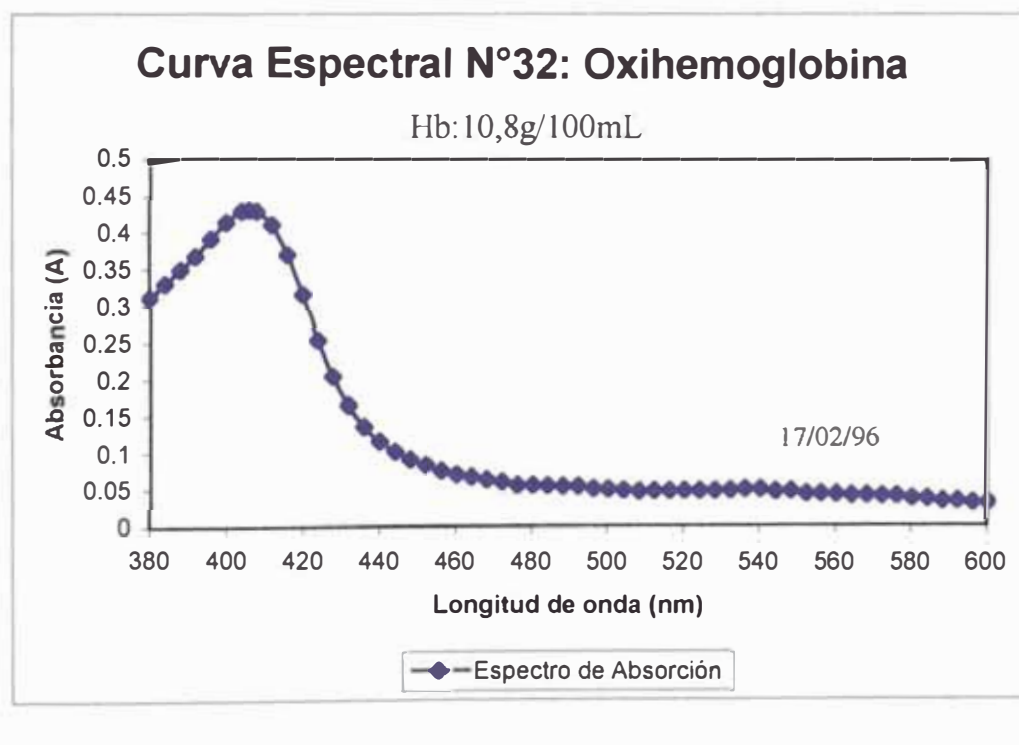
Curva Espectral N°30: Oxihemoglobina saturada



Curva Espectral N°31: Oxihemoglobina saturada



Curva Espectral N°32: Oxihemoglobina saturada



Condiciones Experimentales:

Espectro: Carboxihemoglobina

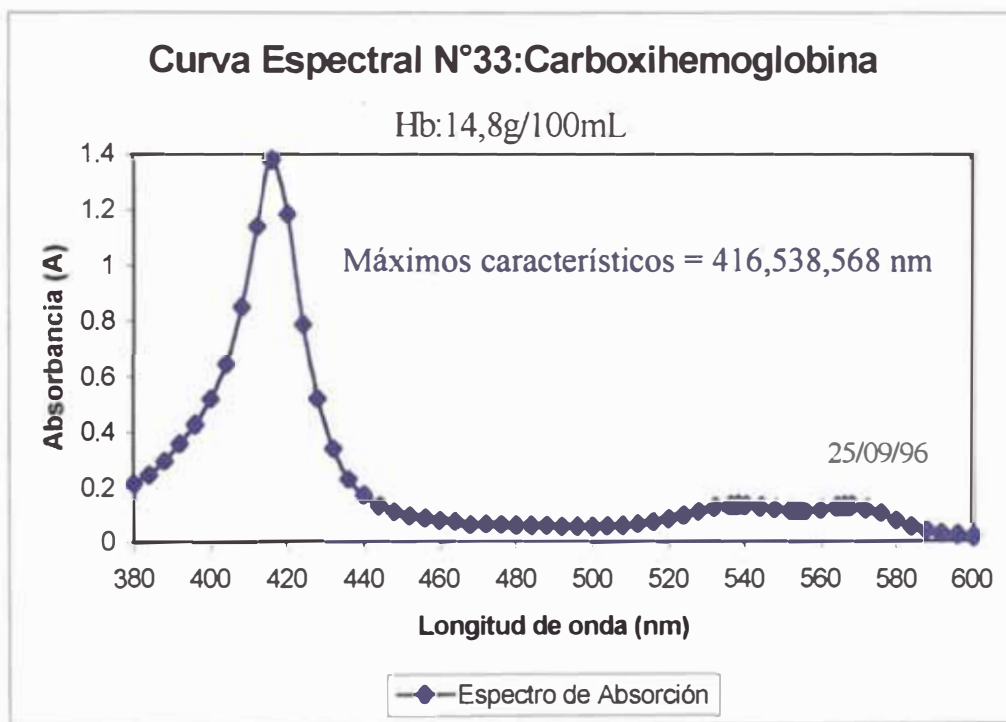
Muestra: Sangre diluida S.I.A. 0,1% saturada con CO

Blanco: S.I.A

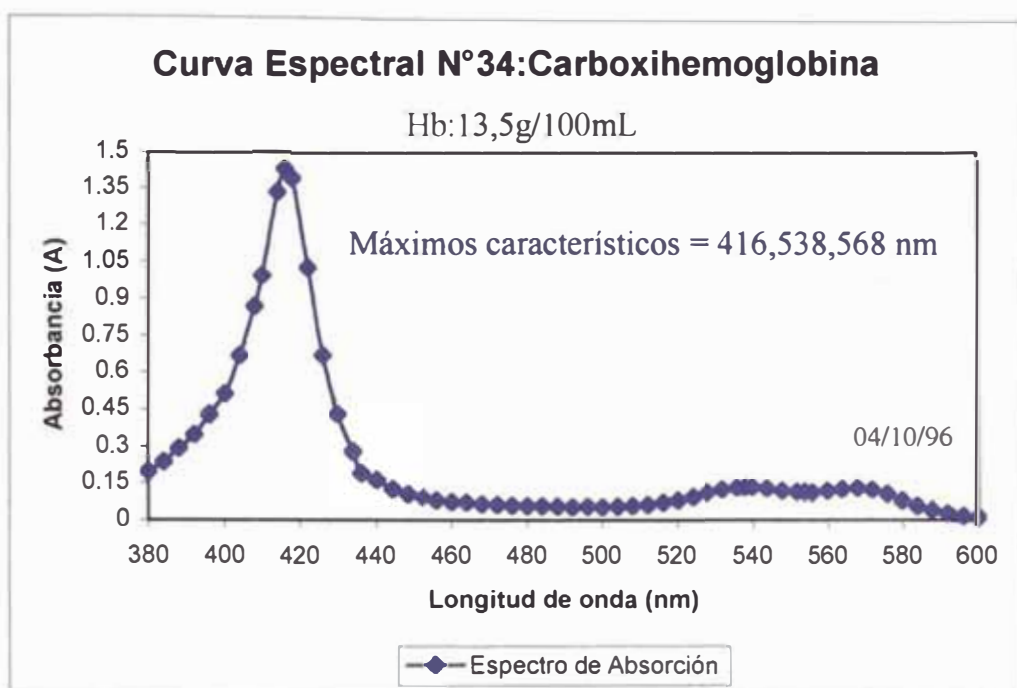
Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)

Operador: MLDA

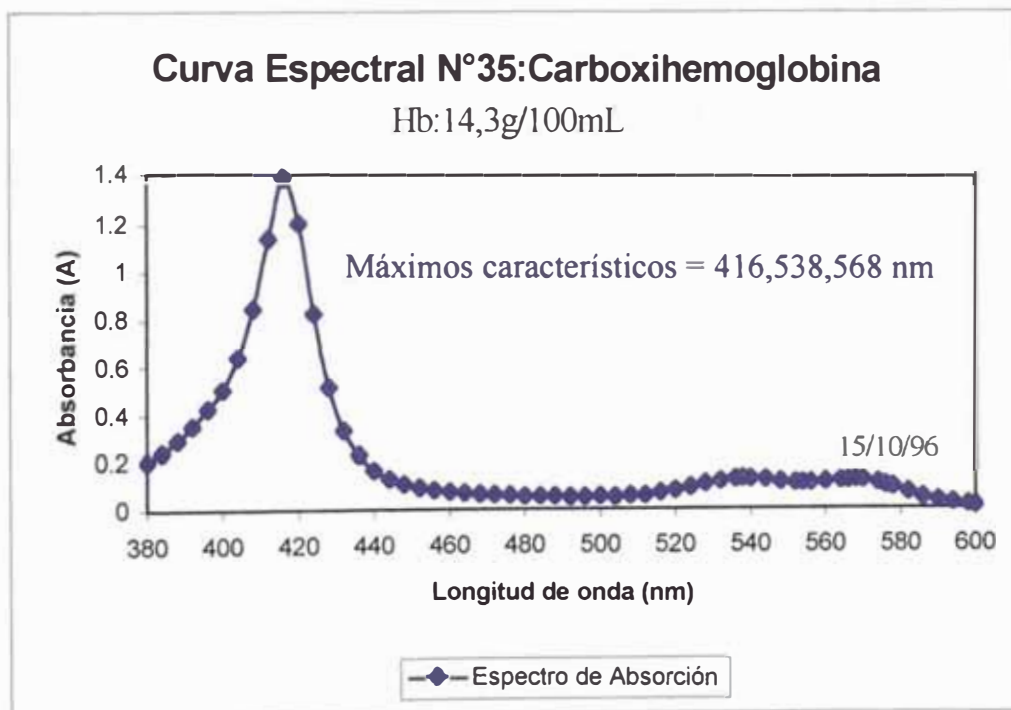
Curva Espectral N°33: Carboxihemoglobina



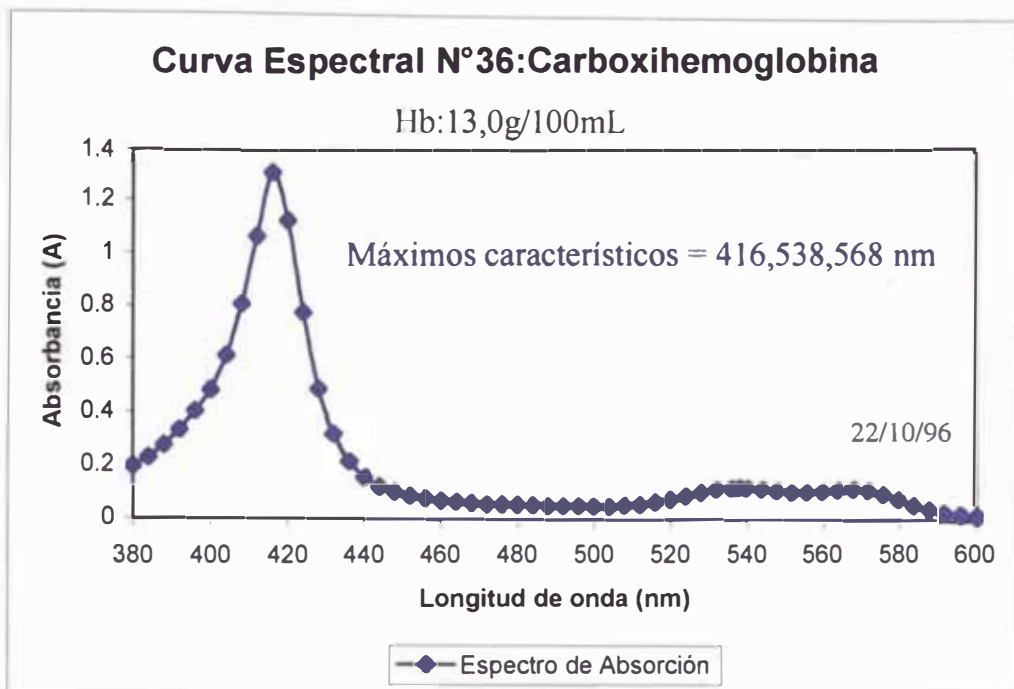
Curva Espectral N°34: Carboxihemoglobina



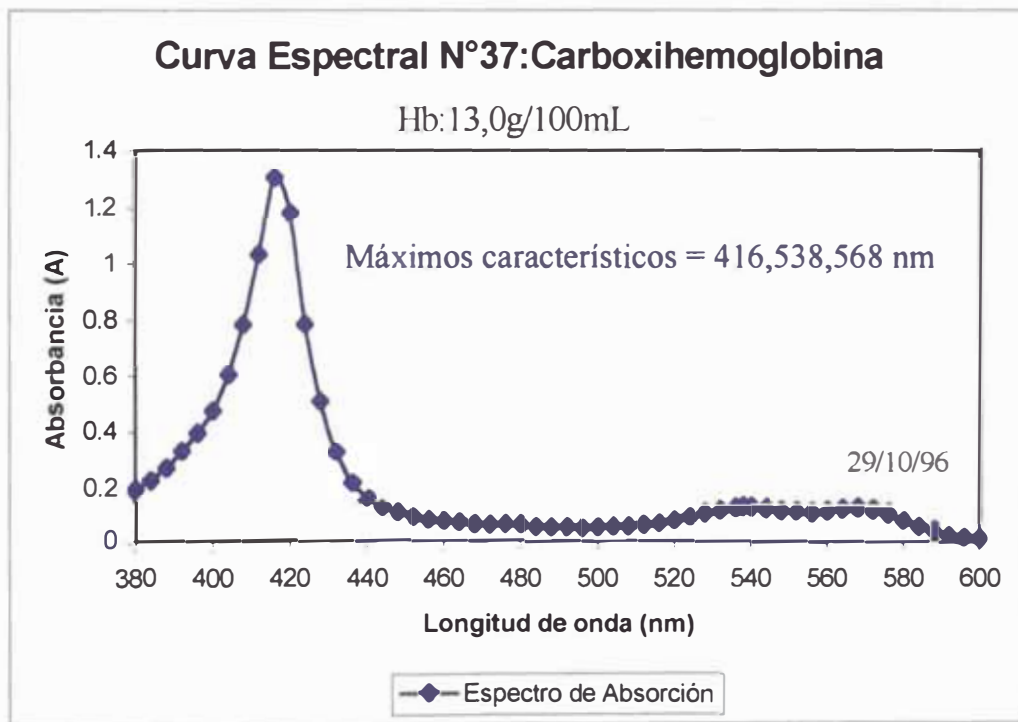
Curva Espectral N°35: Carboxihemoglobina



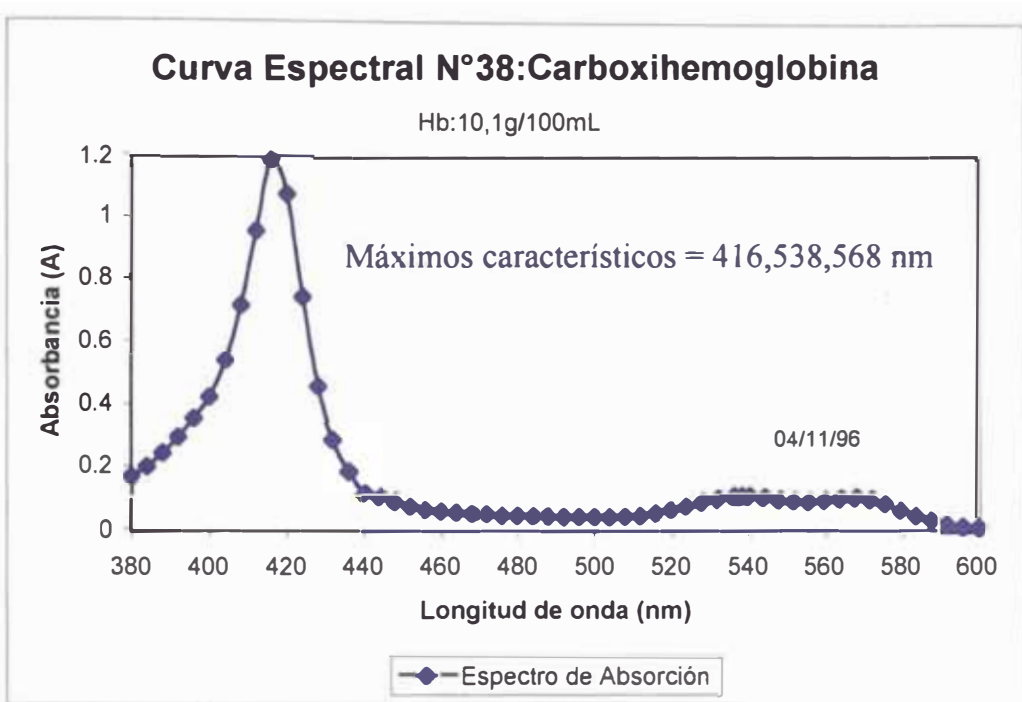
Curva Espectral N°36: Carboxihemoglobina



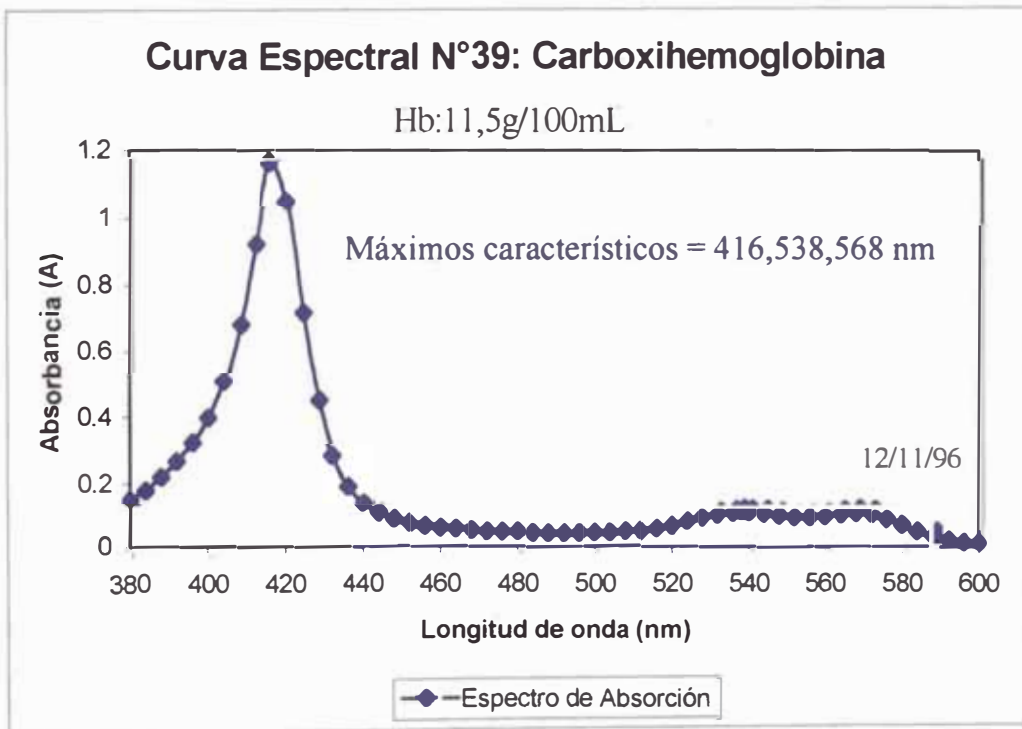
Curva Espectral N°37: Carboxihemoglobina



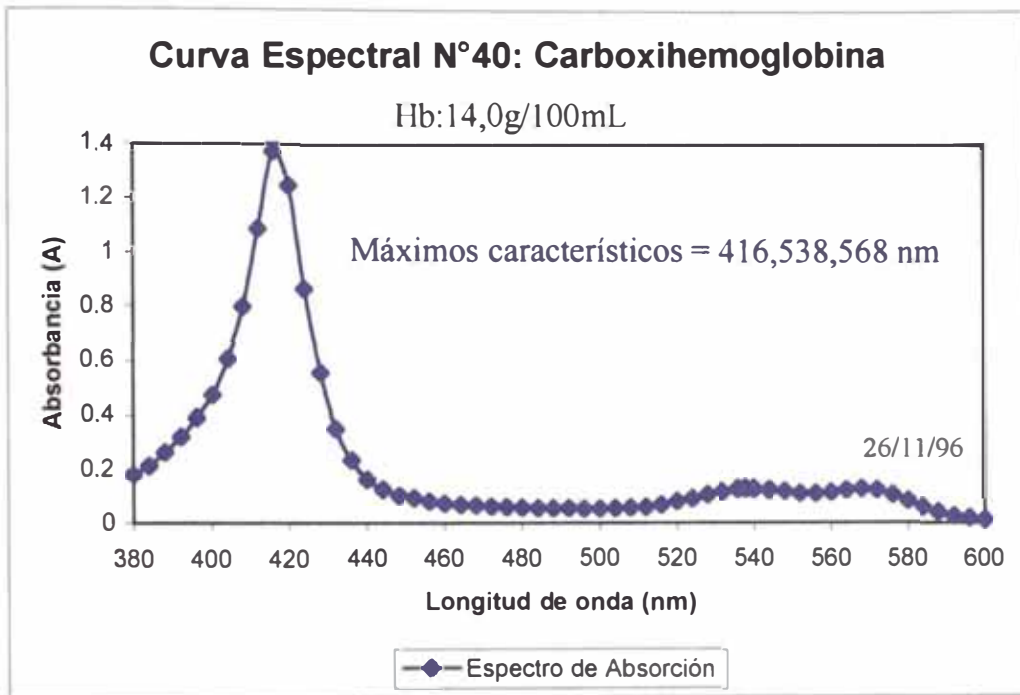
Curva Espectral N°38: Carboxihemoglobina



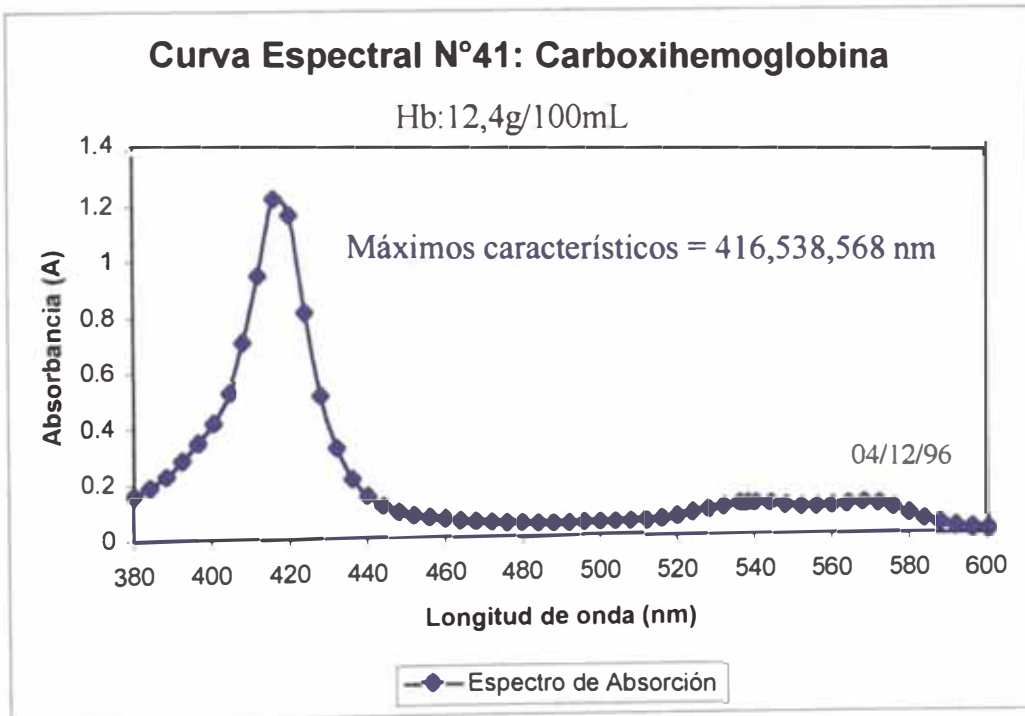
Curva Espectral N°39: Carboxihemoglobina



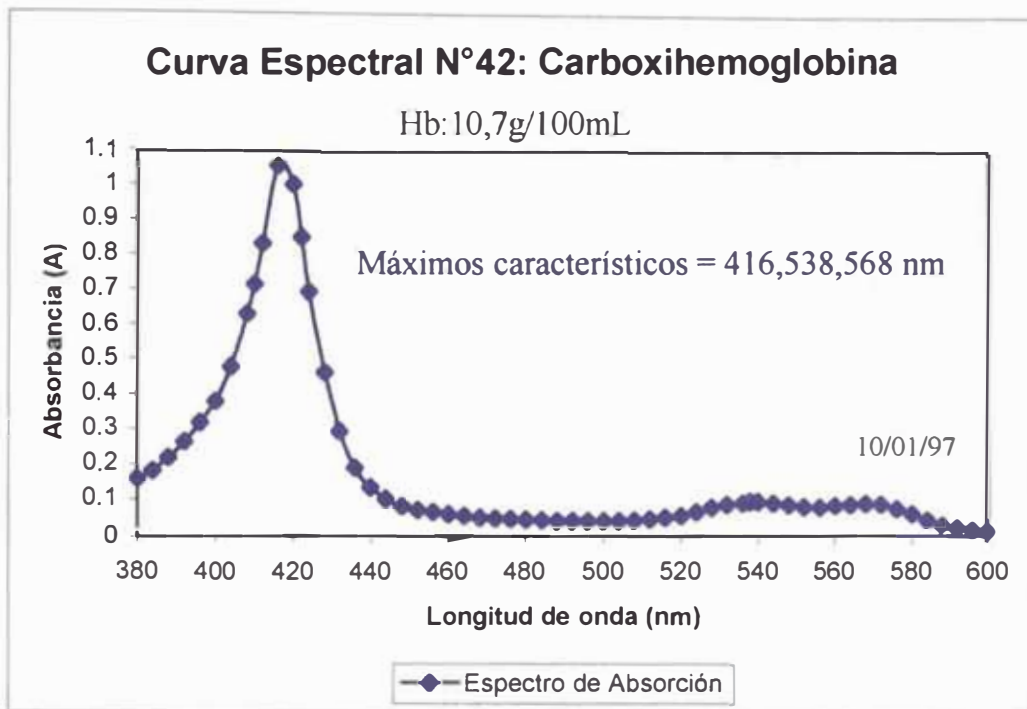
Curva Espectral N°40: Carboxihemoglobina



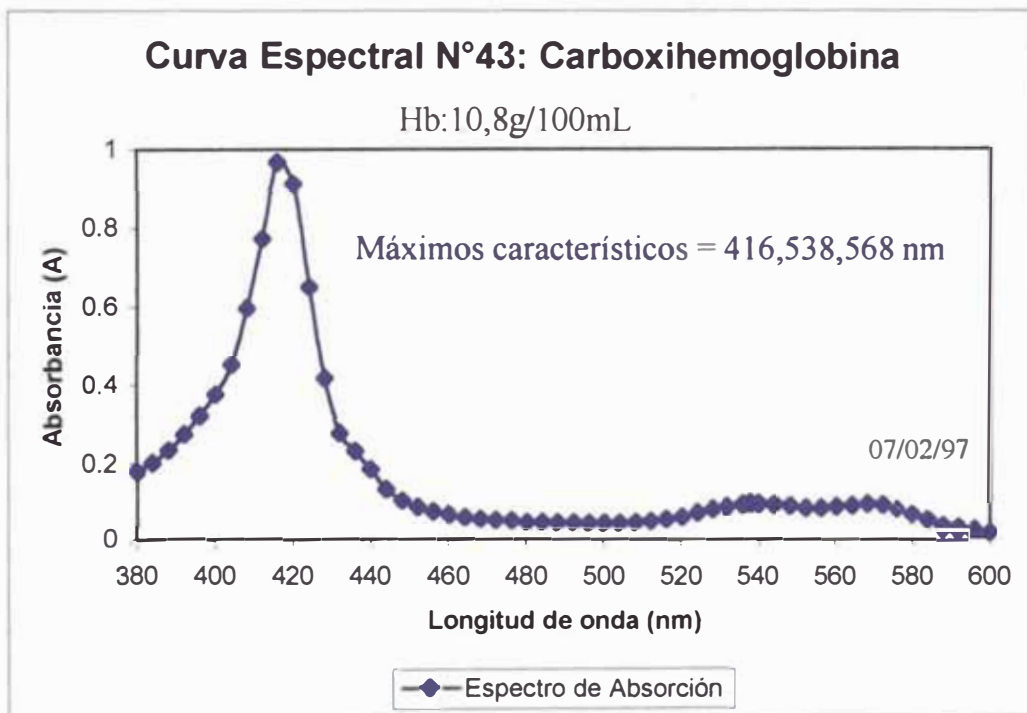
Curva Espectral N°41: Carboxihemoglobina



Curva Espectral N°42: Carboxihemoglobina



Curva Espectral N°43: Carboxihemoglobina



Condiciones Experimentales:

Espectro: Carboxihemoglobina

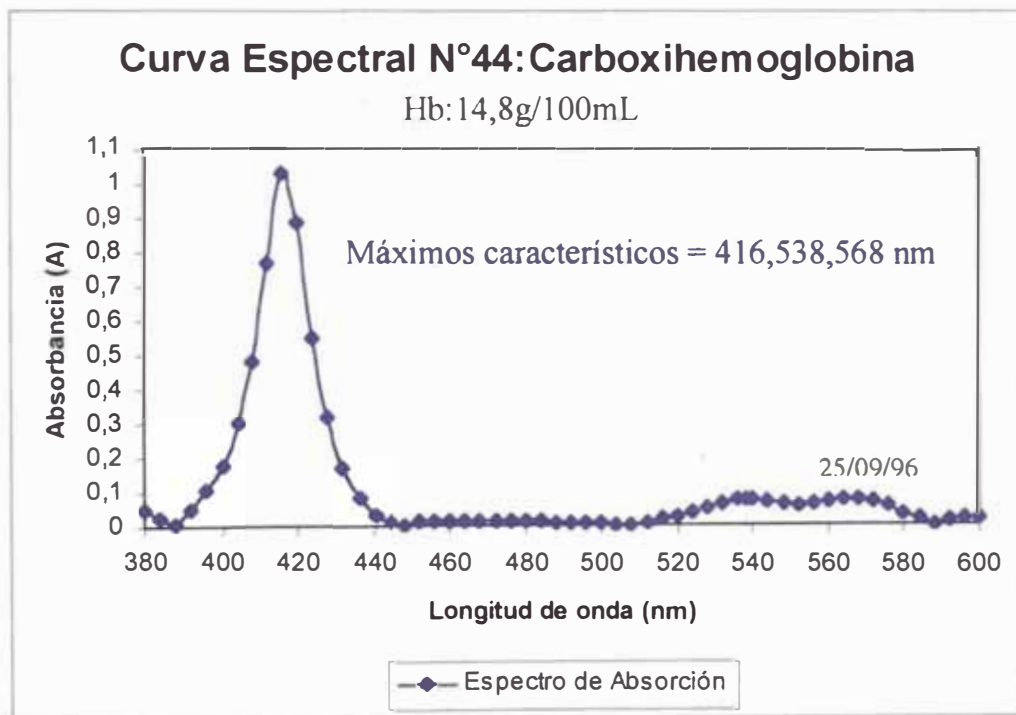
Muestra: Sangre diluída S.I.A. 0,1% saturada con *CO*

Blanco: Oxihemoglobina saturada

Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)

Operador: MLDA

Curva Espectral N°44: Carboxihemoglobina



De los espectros mostrados se obtienen los máximos de absorción atribuidos al intercambio de gases en la hemoglobina.

Tabla N°12: Longitudes de onda experimentales de los derivados de la Hemoglobina

Curvas Espectrales	Máximos de Absorción (nm)
Hemoglobina*	412 (Banda γ Soret), 540 (Banda β), 576 (Banda α)
Oxihemoglobina saturada	380 – 406**(Banda γ Soret)
Carboxihemoglobina	416 (Banda γ Soret), 538 (Banda β), 568 (Banda α)
Hemoglobina desoxigenada***	426 (Banda γ Soret), 556

*La hemoglobina se le conoce como oxihemoglobina⁽²⁵⁾

** El máximo de absorción en los espectros varía entre 380 hasta 406 nm.

***La hemoglobina desoxigenada se le conoce como hemoglobina reducida⁽²⁵⁾

Discusión de Resultados:

Estos datos experimentales coinciden con los datos teóricos (Tabla N°4).

Las bandas de absorción en la región visible de los derivados de la hemoglobina se deben a las transiciones electrónicas π^* (vacante) $\leftarrow \pi$ (ocupado) que se originan por la deslocalización electrónica de los dobles enlaces del anillo porfirínico. Debido a la gran deslocalización electrónica en torno al metal *Fe (II)* pueden ocurrir transiciones del tipo **transferencia de carga** que son observadas en la región UV. También ocurren las transiciones del tipo **d-d** del *Fe (II)* que son observadas en la región IR. El desplazamiento químico de las bandas son atribuidas al intercambio de ligandos que se unen al metal *Fe (II)* en su sexta posición y dan longitudes características a cada derivado. Las bandas típicas de una metaloporfirina de Fe (II) son las bandas α , β y γ que aparecen de mayor a menor longitud de onda en el espectro visible, la banda γ es denominada Soret.

El espectro de la hemoglobina y la carboxihemoglobina presentan las 3 típicas bandas (γ Soret, α y β) pero el espectro de la oxihemoglobina saturada (hemoglobina totalmente saturada con O_2) presenta solo la banda de Soret como una banda ancha y una absorbancia mucho menor que los demás espectros y no se aprecian las bandas α y β , podemos explicarlo porque en el complejo de la oxihemoglobina se forma el superoxo compuesto $Fe(III)-O_2^-$, por lo que localiza la densidad electrónica del anillo hacia el enlace del $Fe(III)-O_2^-$ y disminuye la probabilidad de las transiciones electrónicas en el anillo quedando minimizadas. En la oxihemoglobina también esta banda γ Soret aparece

como una banda desplazada hacia el UV, esto podemos explicarlo por la mayor tendencia que tiene el complejo $Fe(III)-O_2^-$ a presentar transiciones del tipo de transferencia de carga que se observan en la región UV.

Este efecto de localización de densidad electrónica en el anillo no ocurre en la carboxihemoglobina ya que el enlace del $Fe-CO$ es altamente covalente por retrodonación y mantiene el estado de oxidación del $Fe(II)$.

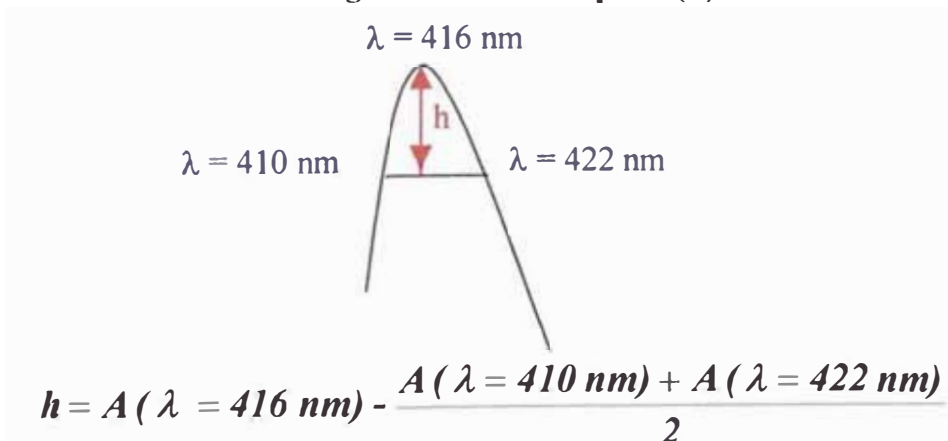
En el espectro de la hemoglobina desoxigenada el $Fe(II)$ se encuentra pentacoordinado y se ubica arriba del centro del anillo en estado de espín alto. Aparece la banda γ Soret y la banda a 556 nm que también corresponden a transiciones electrónicas π (vacante) \leftarrow π (ocupado) en el anillo porfirínico.

Los máximos de absorción de los espectros obtenidos de la hemoglobina, la oxihemoglobina y la carboxihemoglobina sirven para definir el método espectrofotométrico (*Cálculo del %HbCO en Muestras de Sangre*).

Se mide la altura óptica que representa la capacidad de carboxilarse y la diferencia óptica que representa la capacidad de oxigenarse en el espectro de la hemoglobina de la sangre problema tomando como referencia la oxihemoglobina saturada, ya que en su espectro visibles las bandas quedan minimizadas y sirven de base para determinar las absorbancias debidas a la oxigenación y a la carboxilación.

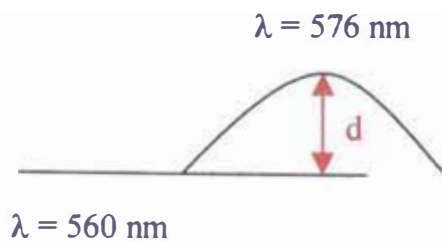
La capacidad de carboxilarse se mide tomando una altura de absorbancia, esta altura se escoge de manera que no tenga interferencias con los otros espectros y sea representativa del CO ligado a la hemoglobina, experimentalmente se toma la absorbancia promedio entre 410 y 422 nm que fijan una paralela a la línea base, la diferencia entre la absorbancia de la longitud de onda máxima de la carboxihemoglobina a 416 nm y la absorbancia promedio de la paralela define la altura óptica.

Carboxihemoglobina: Altura óptica (h)



La capacidad de oxigenarse se mide tomando una altura de absorbancia, esta altura se escoge de manera que no tenga interferencias con los otros espectros y sea representativa del O_2 ligado a la hemoglobina, experimentalmente se toma la diferencia entre la absorbancia de la longitud de onda máxima de la hemoglobina a 576 nm y la absorbancia mínima a 560 nm y esto define la diferencia óptica.

Hemoglobina: Diferencia óptica (d)



$$d = A(\lambda = 576 \text{ nm}) - A(\lambda = 560 \text{ nm})$$

Experimentalmente en la obtención de los espectros se observa lo siguiente:

El pH de dilución de la muestra de sangre debe ser ligeramente básica por el “Efecto Bohr”^(3,25) para favorecer la unión de la hemoglobina con el oxígeno y con los gases que se unen a ella como el monóxido de carbono, por ello se emplea un pH de 12,3 que se consigue con el medio amoniacal que no interfiere en los espectros.

Los espectros iniciales se realizaron a partir de sangre donada por el Centro Médico de la UNI, quienes usaban oxalato de potasio como anticoagulante (*Proyecto de Tesis I*)⁽¹²⁾, el cual puede descomponer el CO enlazado con la hemoglobina en CO_2 , por lo cual se llevó a cabo espectros con citrato de sodio como anticoagulante (*Proyecto de Tesis II*)⁽¹³⁾ y en este último trabajo se llevó a cabo tubos de extracción VENOJECT®II (*Anexo N°3*) que usa como anticoagulante K_2EDTA y se encuentra en tubos de plástico cerrados al vacío y que permite la extracción directa mediante un sistema automático y manual.

Se comprobó espectrofotométricamente que no existe variación en la absorbancia de los espectros visibles obtenidos con sangre preparada en disolución isotónica amoniacal S.I.A. que con disolución amoniacal S.A. por lo cual se modificó el método inicial al empleo de únicamente la disolución amoniacal. La estabilidad iónica y la presión osmótica de la hemoglobina se mantiene espectralmente en la disolución amoniacal.

Las lecturas espectrofotométricas deben realizarse lo más rápido posible porque sus espectros varían con el tiempo, se debe evitar el contacto con el aire una vez extraída y durante todo el procedimiento, por lo cual se trabaja siempre con teflón y parafilm. La *HbCO* tiene un tiempo de estabilidad experimental de 2 horas. La *HbO₂* saturada tiene un tiempo de duración de 1 hora, ya que pierde oxígeno variando su espectro de absorción.

3.1.2 Cálculo de los Coeficientes de Absortividad Promedio de los derivados de la Hemoglobina:

Estos cálculos se realizan como parte del estudio de los espectros de los derivados de la hemoglobina.

PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

Espectro Óptico: Rango Visible
 Muestra: Hemoglobina (Llamada Oxihemoglobina)⁽²⁵⁾
 Blanco: Solución Isotónica Amoniacal (S.I.A.)
 Máximos de absorción: 412, 540 y 576 nm.
 Determinación del Coeficiente de Absortividad Promedio: (ϵ) cm.mM⁻¹

Tabla N°13: Coeficiente de Absortividad Promedio (ϵ) a 412 nm de la Hemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. Hb (mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente Ext. Molar (ϵ) cm.mM ⁻¹
1,098	14,8	0,009178	1	119,6
1,125	14,3	0,008868	1	126,9
1,046	13,0	0,008062	1	129,7
1,052	13,0	0,008062	1	130,5
0,928	10,1	0,006264	1	148,1
0,92	11,5	0,007132	1	129
1,095	14,0	0,008682	1	126,1
1,052	14,0	0,008682	1	121,2
1,105	14,0	0,008682	1	127,3
1,125	14,0	0,008682	1	129,6
0,981	12,4	0,00769	1	127,6
0,972	12,4	0,00769	1	126,4
0,975	12,4	0,00769	1	126,4
0,846	10,7	0,006636	1	127,5
0,831	10,8	0,006698	1	124,1

Coeficiente de Absortividad Promedio (412 nm) = 128 ± 4,939% (cm.mM)⁻¹
 Desviación Estándar* = 6,322
 % Coeficiente de Variación* = 4,939

* (Anexo N°10)

Tabla N°14: Coeficiente de Absortividad Promedio (ϵ) a 540 nm de la Hemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. Hb (mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente de Absortividad (ϵ) cm.mM ⁻¹
0,131	14,8	0,009178	1	14,3
0,129	14,3	0,008868	1	14,5
0,122	13,0	0,008062	1	15,1
0,122	13,0	0,008062	1	15,1
0,105	10,1	0,006264	1	16,8
0,108	11,5	0,007132	1	15,1
0,126	14,0	0,008682	1	14,5
0,121	14,0	0,008682	1	13,9
0,126	14,0	0,008682	1	14,5
0,131	14,0	0,008682	1	15,1
0,111	12,4	0,00769	1	14,4
0,11	12,4	0,00769	1	14,3
0,111	12,4	0,00769	1	14,4
0,096	10,7	0,006636	1	14,5
0,096	10,8	0,006698	1	14,3

Coeficiente de Absortividad Promedio (540 nm) = $14,7 \pm 4,630\%$ (cm.mM)⁻¹
 Desviación Estándar = 0,682
 % Coeficiente de Variación = 4,630

Tabla N°15: Coeficiente de Absortividad Promedio (ϵ) a 576 nm de la Hemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. Hb(mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente de Absortividad (ϵ) cm.mM ⁻¹
0,127	14,8	0,009178	1	13,8
0,126	14,3	0,008868	1	14,2
0,121	13,0	0,008062	1	15,0
0,12	13,0	0,008062	1	14,9
0,104	10,1	0,006264	1	16,6
0,103	11,5	0,007132	1	14,4
0,124	14,0	0,008682	1	14,3
0,12	14,0	0,008682	1	13,8
0,126	14,0	0,008682	1	14,5
0,128	14,0	0,008682	1	14,7
0,11	12,4	0,00769	1	14,3
0,108	12,4	0,00769	1	14,0
0,11	12,4	0,00769	1	14,3
0,095	10,7	0,006636	1	14,3
0,094	10,8	0,006698	1	14,0

Coeficiente de Absortividad Promedio (576 nm) = $14,5 \pm 4,731\%$ (cm.mM)⁻¹
 Desviación Estándar = 0,686
 % Coeficiente de Variación = 4,731

PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

Espectro Óptico: Rango Visible

Muestra: Carboxihemoglobina

Blanco: Solución Isotónica Amoniacal (S.I.A.)

Máximos de absorción: 416, 538 y 568 nm.

Determinación del Coeficiente de Absortividad Promedio: (ϵ) cm.mM^{-1}

Tabla N°16: Coeficiente de Absortividad Promedio (ϵ) a 416 nm de la Carboxihemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. HbCO(mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente de Absortividad (ϵ) cm.mM^{-1}
1,343	14,8	0,009178	1	146,3
1,43	13,5	0,008372	1	170,8
1,39	14,3	0,008868	1	156,7
1,305	13,0	0,008062	1	161,9
1,305	13,0	0,008062	1	161,9
1,09	10,1	0,006264	1	174,0
1,165	11,5	0,007132	1	163,3
1,39	14,0	0,008682	1	160,1
1,328	14,0	0,008682	1	153,0
1,38	14,0	0,008682	1	158,0
1,42	14,0	0,008682	1	163,6
1,24	12,4	0,00769	1	161,2
1,225	12,4	0,00769	1	159,3
1,227	12,4	0,00769	1	159,6
1,073	10,7	0,006636	1	161,7
1,08	10,7	0,006636	1	162,7
1,058	10,8	0,006698	1	158,0

Coeficiente de Absortividad (416 nm) = $160,7 \pm 3,820\%$ (cm.mM^{-1})

Desviación Estándar = 6,139

% Coeficiente de Variación = 3,820

Tabla N°17: Coeficiente de Absortividad (ϵ) a 538 nm de la Carboxihemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. HbCO(mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente de Absortividad (ϵ) cm.mM ⁻¹
0,128	14,8	0,009178	1	13,9
0,135	14,3	0,008868	1	16,1
0,129	13,5	0,008372	1	14,5
0,122	13,0	0,008062	1	15,1
0,123	13,0	0,008062	1	15,3
0,11	10,1	0,006264	1	17,6
0,107	11,5	0,007132	1	15,0
0,13	14,0	0,008682	1	15,0
0,124	14,0	0,008682	1	14,3
0,126	14,0	0,008682	1	14,5
0,133	14,0	0,008682	1	15,3
0,113	12,4	0,00769	1	14,7
0,114	12,4	0,00769	1	14,8
0,111	12,4	0,00769	1	14,4
0,099	10,7	0,006636	1	14,9
0,097	10,7	0,006636	1	14,6
0,096	10,8	0,006698	1	14,3

Coeficiente de Absortividad Promedio (538 nm) = $15 \pm 5,647\%$ (cm.mM)⁻¹

Desviación Estándar = 0,847

% Coeficiente de Variación = 5,647

Tabla N°18: Coef. Absortividad Promedio (ϵ) a 568 nm de la Carboxihemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. HbCO(mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente de Absortividad (ϵ) cm.mM ⁻¹
0,124	14,8	0,009178	1	13,5
0,132	13,5	0,008372	1	15,8
0,124	14,3	0,008868	1	14,0
0,119	13,0	0,008062	1	14,8
0,119	13,0	0,008062	1	14,8
0,106	10,1	0,006264	1	16,9
0,104	11,5	0,007132	1	14,6
0,127	14,0	0,008682	1	14,6
0,121	14,0	0,008682	1	13,9
0,124	14,0	0,008682	1	14,3
0,13	14,0	0,008682	1	15,0
0,111	12,4	0,00769	1	14,4
0,112	12,4	0,00769	1	14,6
0,109	12,4	0,00769	1	14,2
0,097	10,7	0,006636	1	14,6
0,095	10,7	0,006636	1	14,3
0,095	10,8	0,006698	1	14,2

Coeficiente de Absortividad Promedio (568 nm) = $14,6 \pm 5,294\%$ (cm.mM)⁻¹

Desviación Estándar = 0,773

% Coeficiente de Variación = 5,294

Discusión de Resultados:

Hb: Coeficientes de extinción molar promedio a las longitudes de onda máxima

$$\epsilon (412 \text{ nm}) = 128 \pm 4,939\% (\text{cm.mM})^{-1}$$

$$\epsilon (540 \text{ nm}) = 14,7 \pm 4,630\% (\text{cm.mM})^{-1}$$

$$\epsilon (576 \text{ nm}) = 14,5 \pm 4,731\% (\text{cm.mM})^{-1}$$

HbCO: Coeficientes de extinción molar promedio a las longitudes de onda máxima

$$\epsilon (416 \text{ nm}) = 160,7 \pm 3,820\% (\text{cm.mM})^{-1}$$

$$\epsilon (538 \text{ nm}) = 15 \pm 5,647\% (\text{cm.mM})^{-1}$$

$$\epsilon (568 \text{ nm}) = 14,6 \pm 5,294\% (\text{cm.mM})^{-1}$$

Estos datos experimentales coinciden con los datos teóricos (*Tabla N°4*)⁽²⁵⁾.

Estos cálculos no se utilizan en el Método Espectrofotométrico que se basa en la altura y diferencia óptica pero nos sirven para identificar los espectros.

3.1.3 Curvas de Saturación de la Hemoglobina:

Se realiza una curva experimental de carboxilación y de desoxigenación de una misma muestra de sangre sin contaminar hasta saturarla totalmente con CO , midiendo el porcentaje de carboxihemoglobina ($\%HbCO$) durante el proceso por el Método Espectrofotométrico.

Estos cálculos se realizan para estudiar el comportamiento de la hemoglobina frente al intercambio del O_2 por el CO en la sexta posición del $Fe (II)$ ubicado en el anillo porfirínico.

Tabla N°19: Carboxilación (Altura óptica versus $\%HbCO$)

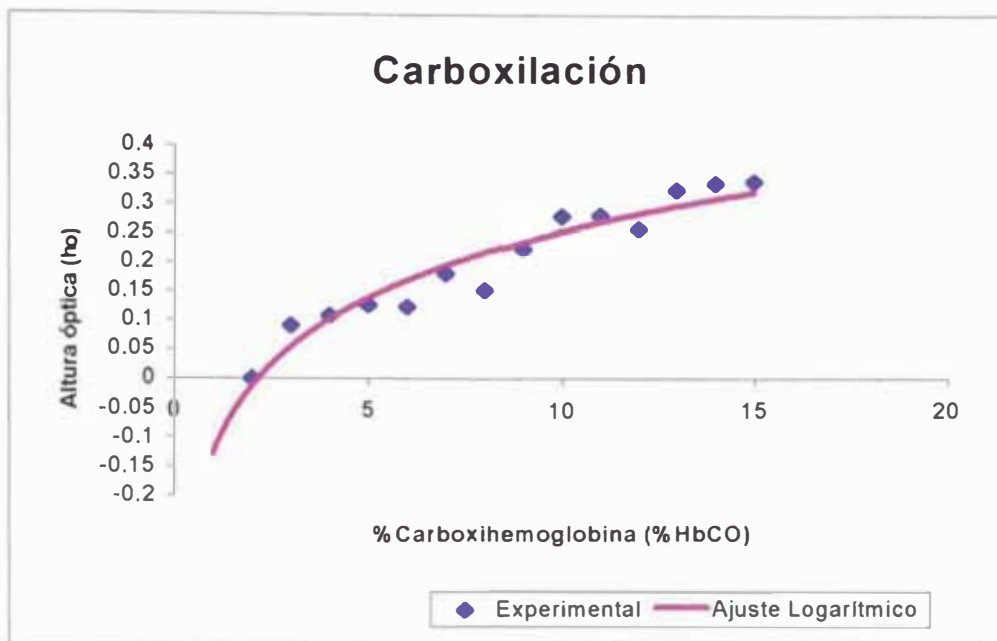
Desoxigenación (Diferencia óptica versus $\%HbCO$)

<i>Altura óptica (h)</i>	<i>Diferencia óptica (d)</i>	<i>$\%HbCO$</i>
0,091	0,032	1,53
0,109	0,033	1,79
0,127	0,035	1,96
0,124	0,022	3,03
0,181	0,027	3,61
0,1525	0,022	3,73
0,226	0,031	3,92
0,2795	0,007	21,496
0,28075	0,007	21,592
0,258	0,006	23,149
0,326	0,005	35,1
0,337	0,004	45,36
0,3395	0,004	45,69
0,37	0,002	99,596
0,3715	0,002	100

*Muestra de sangre de Hb = 10,6 g/100 mL.

Se expresan los resultados experimentales en los *Gráficos N°1 y 2*.

Gráfico N°1: Carboxilación de la Hemoglobina

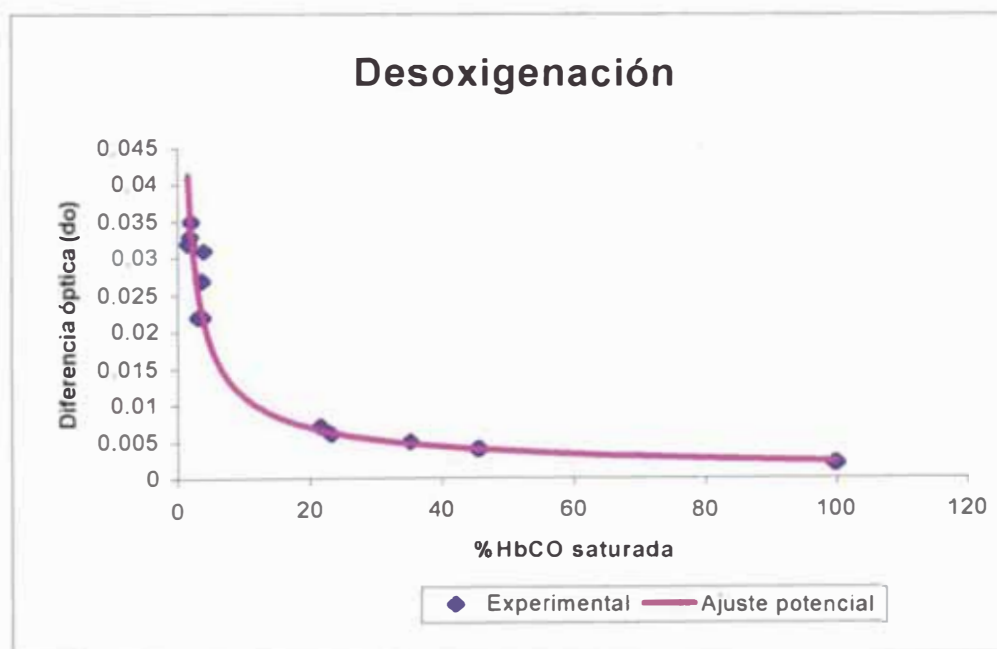


Ecuación de la Curva de Carboxilación:

$$y_1 = 0.166\ln(x) - 0.128$$

$$R^2 = 0,920^*$$

Gráfico N°2: Desoxigenación de la hemoglobina



Ecuación de la Curva de Desoxigenación:

$$y_2 = 0.055x^{-0.695}$$

$$R^2 = 0,980^*$$

*R² es un parámetro estadístico que representa la aproximación al ajuste de la curva.

Discusión de Resultados:

El estudio de las curvas de saturación muestra que la tendencia de la hemoglobina a carboxilarse ocurre logarítmicamente (y_1) y al desoxigenarse sigue una curva potencial (y_2).

Teóricamente estos comportamientos se explican por la mayor tendencia de la hemoglobina en enlazarse con el CO que con el O_2 , al inicio se observa que la entrada de CO es rápida y que la salida de O_2 también. Todo esto se explica por la mayor estabilidad de la carboxihemoglobina con respecto a la oxihemoglobina.

Estas curvas de saturación son comprobadas empleando el Método Espectrofotométrico.

3.2 Pruebas Cualitativas de Identificación de la Carboxihemoglobina

(HbCO): (16, 22)

Se expresan los resultados experimentales en la *Tabla N°20*.

Tabla N°20: Identificación Cualitativa de la Carboxihemoglobina

Prueba	Observaciones
De Desoxigenación	La <i>HbCO</i> permanece con el color rojo cereza y la muestra de <i>HbO₂</i> cambia de color a marrón oscuro que identifica la <i>Hb</i> desoxigenada.
Espectrofotométrica	El espectro de la <i>HbO₂</i> cambia con la adición de bisulfito de sodio y resulta el espectro de la <i>Hb</i> desoxigenada (<i>Curva Espectral N°56</i>). El espectro de la <i>HbCO</i> con la adición de bisulfito de sodio corresponde solo al de <i>HbCO</i> (<i>Curva Espectral N°57</i>).
Del Ácido Tánico	La <i>HbCO</i> permanece con el color rojo cereza y la muestra de <i>HbO₂</i> cambia de color a gris oscuro por eliminación del <i>O₂</i> .
Del Ácido Pirogálico - Ácido Tánico: “Método de Sayers-Yant”	Se establece patrones de colores para identificar el % <i>HbCO</i> y por comparación con una muestra de sangre se determina semicuantitativamente el % <i>HbCO</i> en la muestra problema. La <i>HbCO</i> permanece con el color rojo cereza y la muestra de <i>HbO₂</i> cambia de color a marrón oscuro por eliminación del <i>O₂</i> .

Se muestran las curvas espectrales de la carboxihemoglobina y la oxihemoglobina después de la adición del reductor bisulfito de sodio NaHSO_3 .

Condiciones Experimentales:

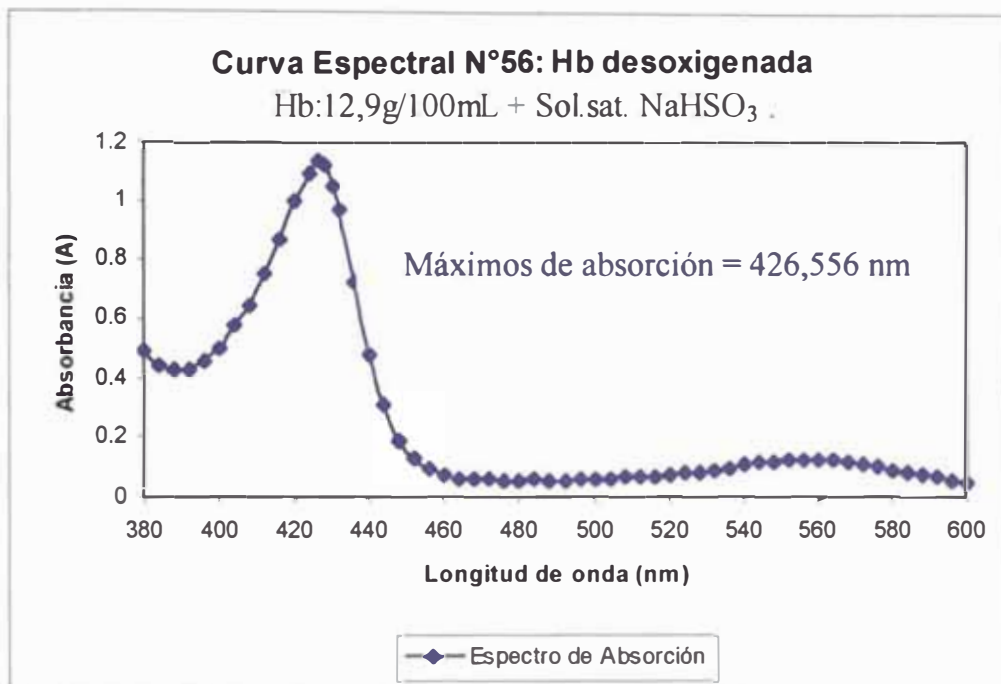
Muestra: Sangre diluída. S.I.A. 0,1%

Blanco: S.I.A

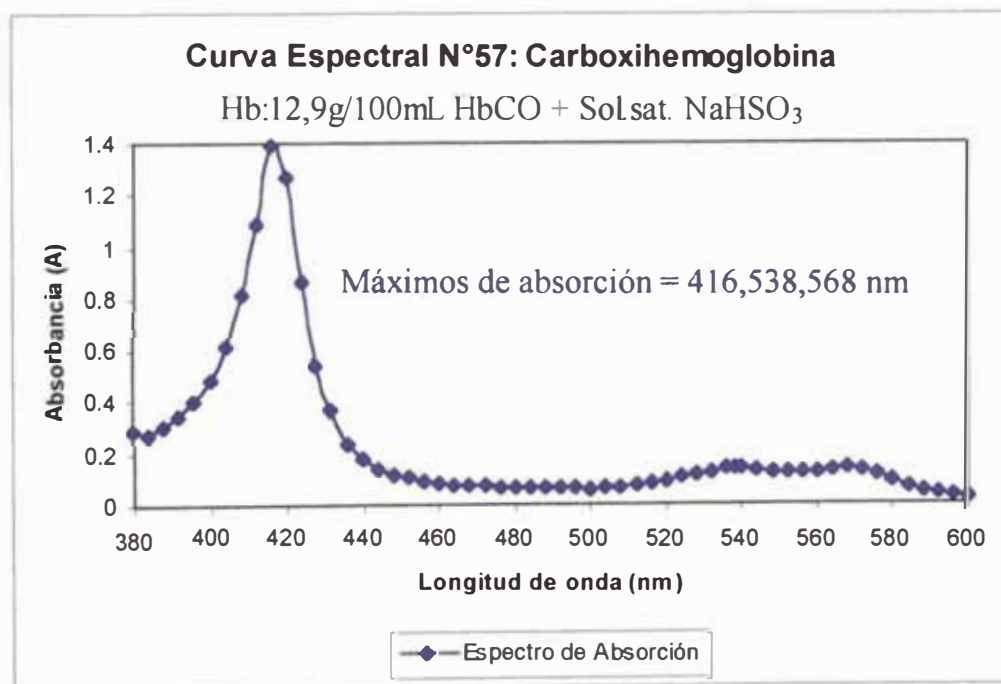
Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)

Operador: MLDA

Curva Espectral N°56: Oxihemoglobina con Reductor (Hemoglobina desoxigenada)



Curva Espectral N°57: Carboxihemoglobina con Reductor



3.3 Determinación de la Hemoglobina “Método de la Metacianohemoglobina”: ^(1,17)

3.3.1 Estudio del Espectro de Absorción de la Metacianohemoglobina:

Se presentan los espectros obtenidos de la metacianohemoglobina.

Condiciones Experimentales:

Espectro: Metacianohemoglobina

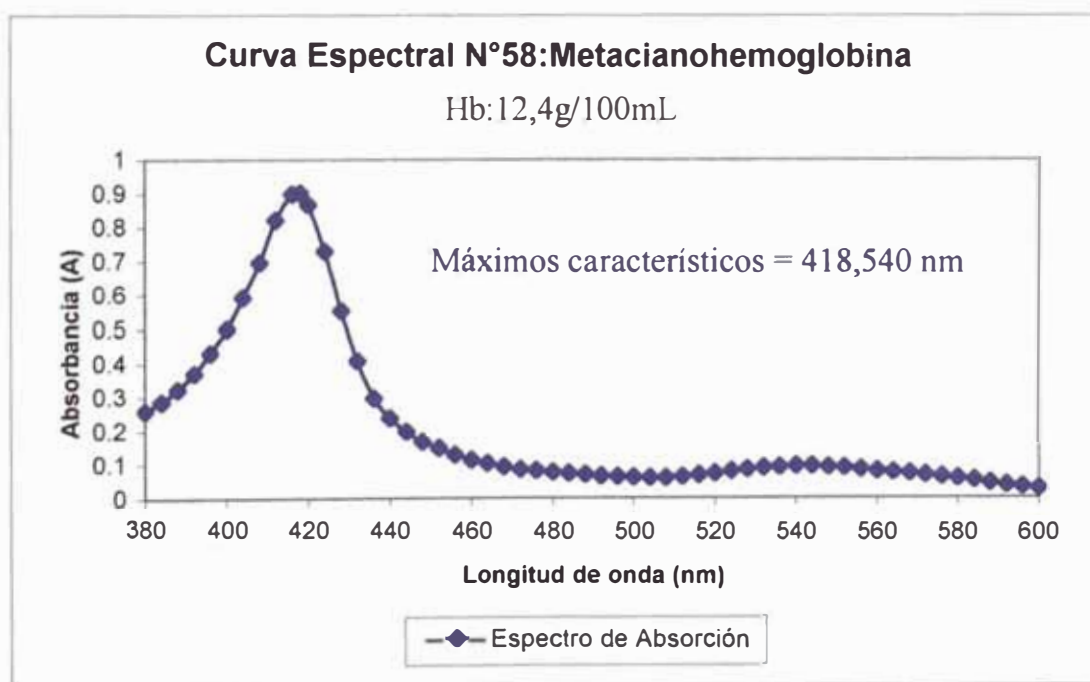
Muestra: 0,02 mL Sangre diluída en 20 mL Reactivo de Drabkin

Blanco: Reactivo de Drabkin

Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)

Operador: MLDA

Curva Espectral N°58: Metacianohemoglobina



Condiciones Experimentales:

Espectro: Metacianohemoglobina

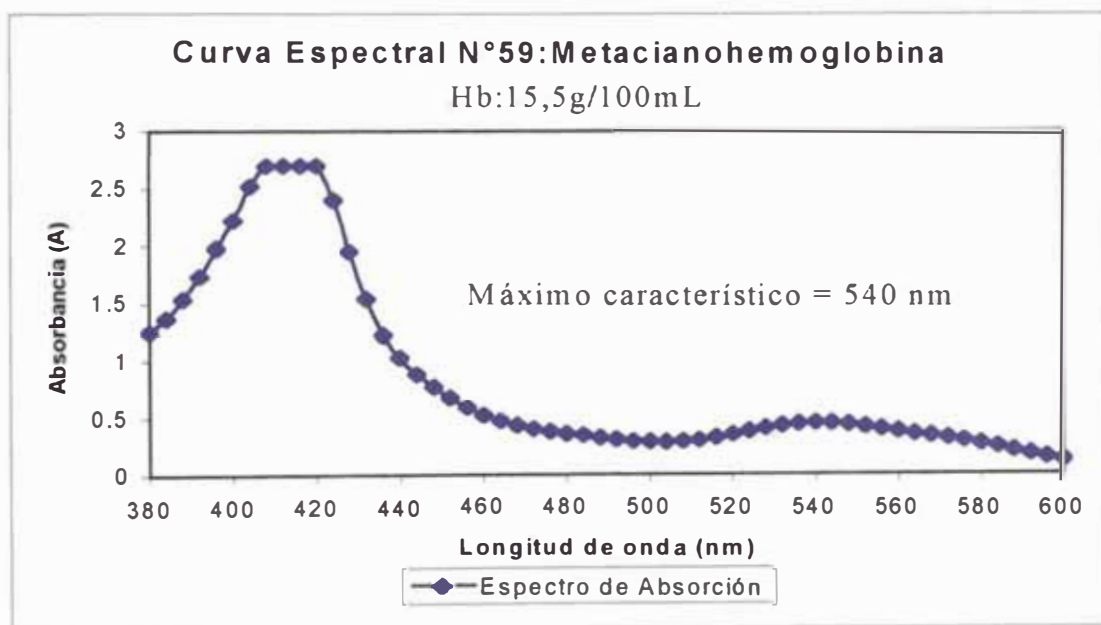
Muestra: 0,02 mL Sangre diluída en 10 mL Reactivo de Drabkin

Blanco: Reactivo de Drabkin

Equipo: Spectronic MR 21D (*Anexo N°5*)

Operador: MLDA

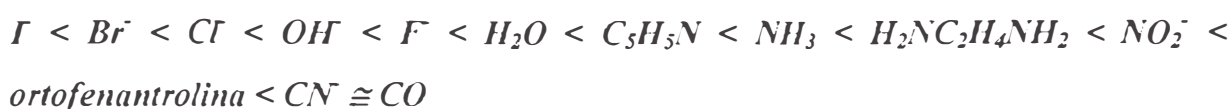
Curva Espectral N°59: Metacianohemoglobina



Discusión de Resultados:

La metacianohemoglobina corresponde a un derivado muy estable de $Fe(III)-CN$ por la “*Serie Espectroquímica*” donde el CN es un ligando de campo fuerte que estabiliza el enlace y por eso se usa para determinar la cantidad de hemoglobina presente en la sangre.

La *Serie Espectroquímica* nos indica la fuerza del campo que generan los ligandos y campos más fuertes generan mayor energía de estabilización:



En el espectro de absorción aparece la banda γ de Soret típica de una metaloporfirina a 418 nm y la banda a 540 nm característica, estas bandas identifican las transiciones electrónicas π (vacante) \leftarrow π (ocupado) en el anillo porfirínico.

Los datos experimentales de los máximos característicos coinciden con los datos teóricos (*Tabla N°4*).

Para calcular la cantidad de hemoglobina (Hb : g/100mL) en las muestras de sangre se usa directamente la Ley de Lambert-Beer midiendo la absorbancia (A) a la longitud de máxima absorción (λ) de la metacianohemoglobina de 540 nm con respecto al reactivo de Drabkin y se compara con la absorbancia del estándar de hemoglobina (Hb : 15,5 g/100mL) en las mismas condiciones experimentales.

$$Hb \text{ (g/100mL)} = A_{(540 \text{ nm})} \times \frac{\text{Concentración Hb del estándar}}{A_{(540 \text{ nm})} \text{ del estándar}}$$

$$Hb \text{ (g/100mL)} = A_{(540 \text{ nm})} \times \frac{15,5}{0,452}$$

Experimentalmente se obtuvo:

$$Hb \text{ (g/100mL)} = A_{(540 \text{ nm})} \times 34,3$$

3.3.2 Cálculo del Coeficiente de Absortividad Promedio de la Metacianohemoglobina:

Estos cálculos se realizan como parte del estudio del espectro de la metacianohemoglobina y para determinar la cantidad de hemoglobina presente a la longitud de onda máxima de 540 nm.

PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

Espectro Óptico: Rango Visible

Muestra: Metacianohemoglobina

Blanco: Reactivo de Drabkin

Máximos característicos: 418 y 540 nm.

Determinación del Coeficiente de Absortividad Promedio: (ϵ) $\text{cm}\cdot\text{mM}^{-1}$

Tabla N°21: Coeficiente de Absortividad (ϵ) a 418 nm de la Metacianohemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. HbCN(mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente de Absortividad (ϵ) $\text{cm}\cdot\text{mM}^{-1}$
0,902	12,4	0,007689	1	117,3

$$\text{Coeficiente de Absortividad (418 nm)} = 117,3 \text{ (cm}\cdot\text{mM)}^{-1}$$

Tabla N°22: Coeficiente de Absortividad Promedio (ϵ) a 540 nm de la Metacianohemoglobina

A(máx)	[Hb] g/100ml	Conc. HbCN(mM)	Longitud de celda (cm)	Coeficiente de Absortividad (ϵ) cm.mM ⁻¹
0,452	15,5	0,038450	1	11,8
0,407	14,0	0,034729	1	11,7
0,4	13,7	0,033984	1	11,8
0,444	15,2	0,037705	1	11,8
0,466	16,0	0,039690	1	11,7
0,437	15,0	0,037209	1	11,7
0,323	11,1	0,027535	1	11,7
0,411	14,0	0,034729	1	11,8
0,403	13,8	0,034233	1	11,8
0,398	13,7	0,033984	1	11,7
0,383	13,1	0,032496	1	11,8
0,412	14,1	0,034977	1	11,8
0,36	12,3	0,030512	1	11,8
0,46	15,8	0,039194	1	11,7
0,426	14,6	0,036217	1	11,8
0,367	12,6	0,031256	1	11,7
0,3615	12,4	0,030760	1	11,8
0,414	14,2	0,035225	1	11,8
0,372	12,8	0,031752	1	11,7
0,414	14,2	0,035225	1	11,8
0,309	10,6	0,026295	1	11,8
0,341	11,7	0,029023	1	11,7
0,351	12,0	0,029767	1	11,8
0,329	11,3	0,028031	1	11,7
0,291	10,0	0,024806	1	11,7
0,339	11,6	0,028775	1	11,8
0,369	12,7	0,031504	1	11,7
0,304	10,4	0,025798	1	11,8
0,363	12,5	0,031008	1	11,7
0,34	11,7	0,029023	1	11,7
0,434	14,9	0,036961	1	11,7
0,358	12,3	0,030512	1	11,7

Coeficiente de Absortividad Promedio (540 nm) = $11,8 \pm 0,25\%$ (cm.mM)⁻¹

Desviación Estándar = 0,0294

% Coeficiente de Variación = 0,25

Discusión de Resultados:

Estos datos experimentales de los coeficientes de absorptividad coinciden con los datos teóricos (Tabla N°4).

3.3.3 Dependencia experimental de la altura óptica (*h*) de la HbCO con la cantidad de la Hb (g/100mL):

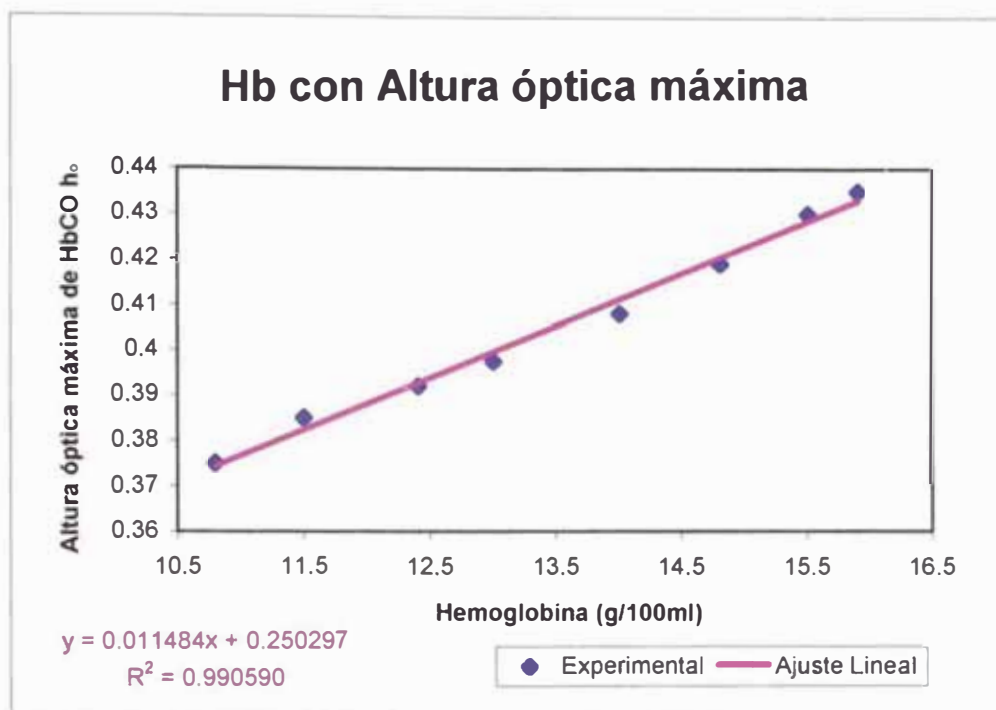
Se da una relación experimental entre la altura óptica de la carboxihemoglobina saturada que se halla por el método espectrofotométrico y la cantidad de hemoglobina dada por el método de la metacianohemoglobina

Tabla N°23: Dependencia de la Hb(g/100mL) con la altura óptica máxima (ho) de la HbCO saturada

HbCO saturada Altura óptica (ho)	Hemoglobina g/100ml
0,435	15,9
0,43	15,5
0,419	14,8
0,408	14,0
0,3975	13,0
0,392	12,4
0,385	11,5
0,375	10,8

Se grafica los datos de cantidad de Hb versus altura óptica máxima de la HbCO saturada: *Gráfico N°3*.

Gráfico N°3: Dependencia de la *Hb* (g/100mL) con la altura óptica máxima (*h_o*) de la *HbCO* saturada



Discusión de Resultados:

Según el *Gráfico N°3* existe una dependencia lineal entre la cantidad de hemoglobina hallada por el Método de la Metacianohemoglobina y la altura óptica máxima de la carboxihemoglobina saturada hallada por el Método Espectrofotométrico.

$$h_o = 0,0115[Hb (g/100mL)] + 0,2503$$

$$R^2 (Ajuste lineal) = 0,990590$$

De esta forma se puede calcular directamente a partir del dato experimental de la hemoglobina *Hb* (g/100mL) toda la carboxihemoglobina que se forma expresada en términos de altura óptica máxima *h_o* alcanzada en las muestras saturadas con *CO*: *Carboxihemoglobina*. Esto permite modificar el método espectrofotométrico y proponer esta medición que da un rango de aplicación al método propuesto de:

Rango de Aplicación del Método Espectrofotométrico Modificado:

$$Hb = 10,8 \text{ (g/100mL) a } Hb = 15,9 \text{ (g/100mL)}$$

Esta relación lineal se explica en base a que el *CN* y el *CO* son ligandos de campo fuerte y los complejos formados altamente estables “*Serie Espectroquímica*”. En el Método Espectrofotométrico toda la *Hb* se acompleja con *CO* para hallar la altura óptica máxima y en el Método de la Metacianohemoglobina toda la *Hb* se acompleja con *CN*, por estas razones usamos el Método de la Metacianohemoglobina para modificar el Método Espectrofotométrico.

El rango de aplicación está en función de los valores de *Hb* de los donantes, niveles menores y mayores deberían ser comprobados.

Método Espectrofotométrico Modificado:

- Se toma 0,01 mL de sangre extraída con anticoagulante K_2EDTA (*Anexo N°3: Equipo de Extracción de la Sangre VENOJECT®II*) y se diluye en 10 mL de solución amoniacal (*Anexo N°4: Disolución de sangre preparada a pH = 12,3*) (**2.1.1.2 Método modificado**).
- Se toma 5 mL de la disolución de la sangre y se satura con O_2 (*Anexo N°1: Equipo de Generación de Oxígeno*). De la Oxihemoglobina saturada se mide la absorbancia a 560 y 576 nm (*Anexo N°5: Espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 21 D*) teniendo como blanco la solución amoniacal y se calcula la diferencia óptica máxima.

$$do = A(\lambda = 576 \text{ nm}) - A(\lambda = 560 \text{ nm})$$

- De los otros 5 mL de la disolución de la sangre: Hemoglobina se mide la absorbancia a 410, 416 y 422 nm (*Anexo N°5: Espectrofotómetro Spectronic Milton*

Roy 21D) teniendo como blanco la oxihemoglobina saturada y se calcula la altura óptica.

$$h = A(\lambda = 416 \text{ nm}) - \frac{A(\lambda = 410 \text{ nm}) + A(\lambda = 422 \text{ nm})}{2}$$

Se mide de igual forma la absorbancia a 560 y 576 nm (*Anexo N°5: Espectrofotómetro Spectronic Milton Roy 21D*) y se calcula la diferencia óptica.

$$d = A(\lambda = 576 \text{ nm}) - A(\lambda = 560 \text{ nm})$$

- Se toma 0,02 mL de sangre extraída con anticoagulante K₂EDTA (*Anexo N°3: Equipo de Extracción de la Sangre VENOJECT®II*) y se diluye en 5 mL de reactivo de Drabkin. Después de 5 minutos de reposo se mide la absorbancia a 540 nm teniendo como blanco el reactivo de Drabkin y se calcula la cantidad de hemoglobina presente (*2.3.2 Procedimiento para la Determinación de Hemoglobina Total en Sangre*)

$$Hb \text{ (g/100mL)} = A_{(540 \text{ nm})} \times 34,3$$

Usando la recta de dependencia de la cantidad de Hb con la altura óptica máxima de la carboxihemoglobina saturada se calcula h_o .

$$h_o = 0,0115[Hb \text{ (g/100mL)}] + 0,2503$$

- Se calcula el porcentaje de carboxihemoglobina en la muestra de sangre por la ecuación (*Cálculo del porcentaje de HbCO en Muestras de Sangre*):

$$\%HbCO = 100 \times \frac{h}{h_o} \times \frac{d_o}{d}$$

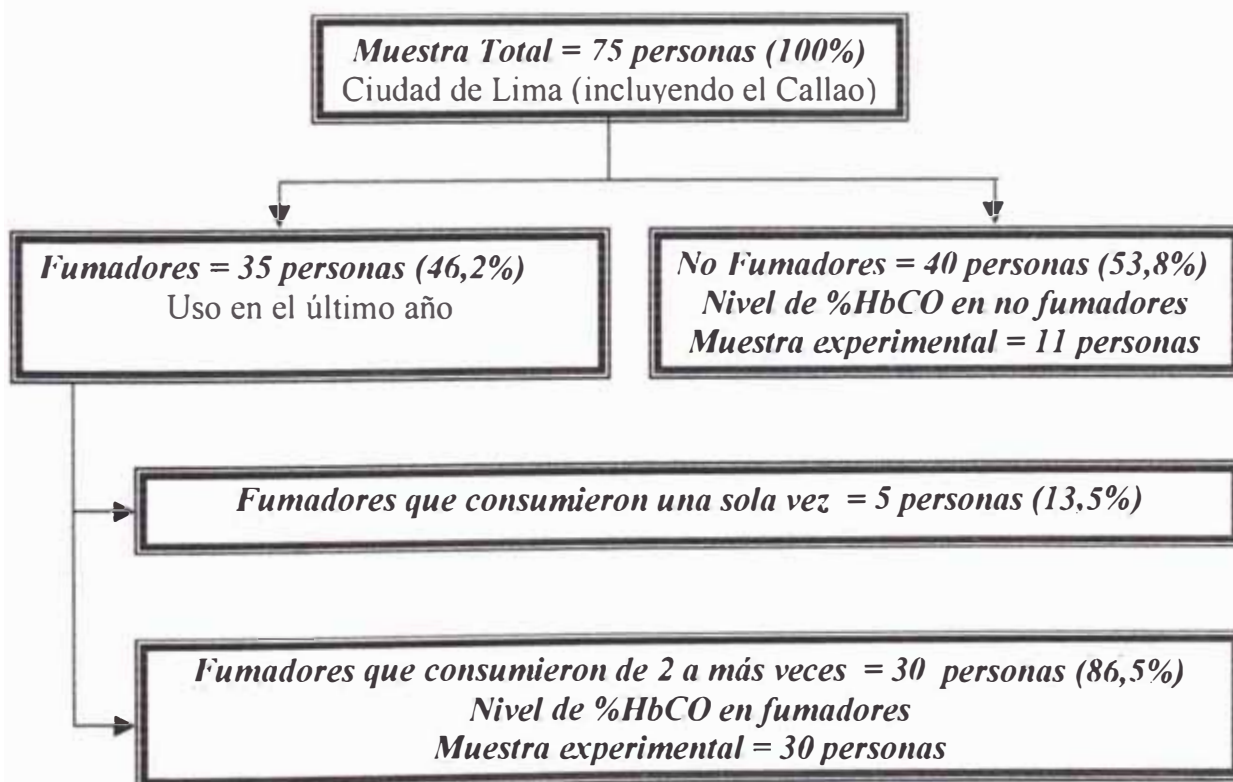
3.4 Evaluación del Nivel de HbCO en no fumadores y fumadores de la Ciudad de Lima: (Anexo N°8)

3.4.1 Muestra Poblacional escogida de la Ciudad de Lima para la aplicación del Método Espectrofotométrico modificado:

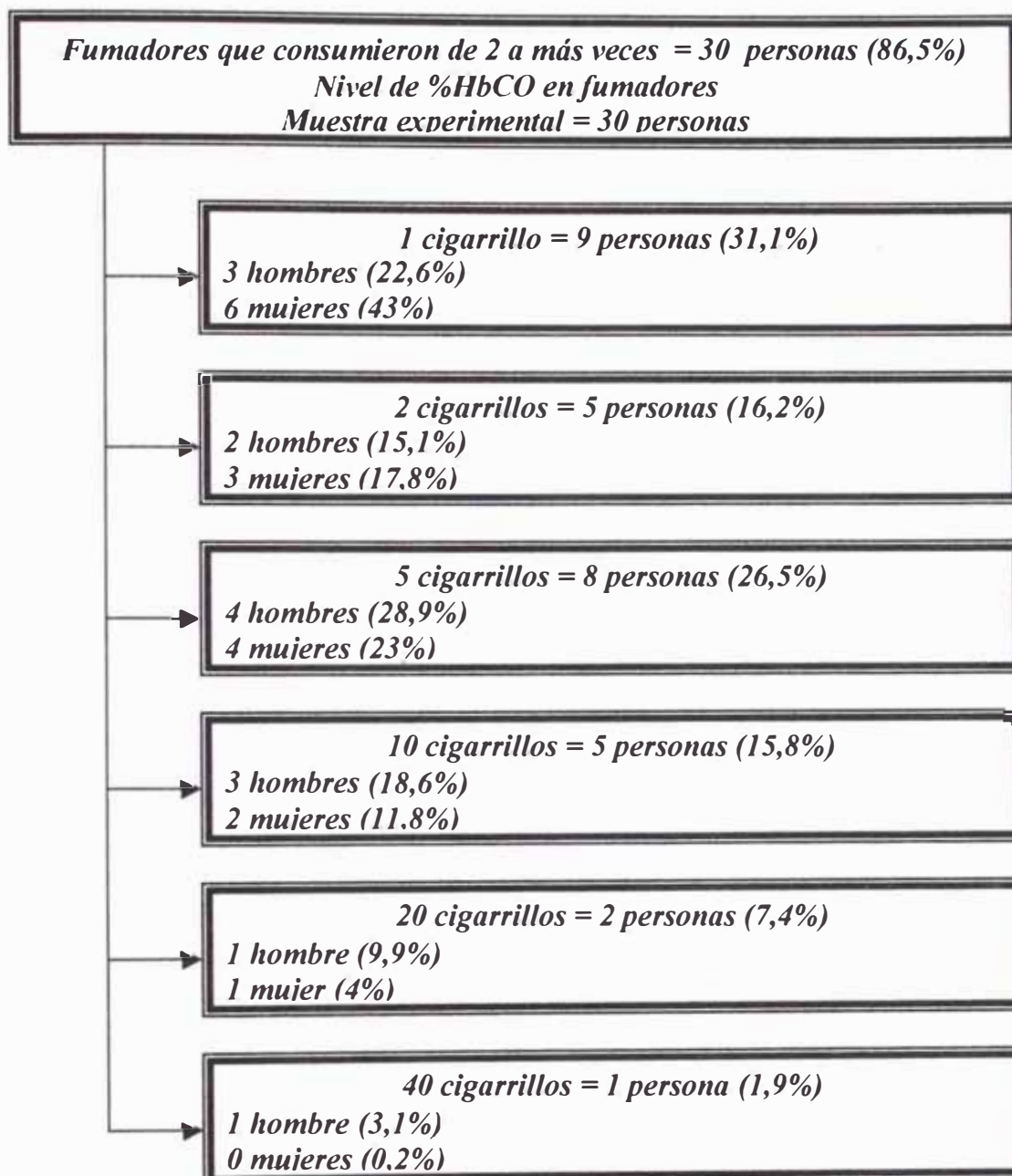
La zona de mayor uso de *tabaco* es Lima, siendo en esta zona, así como en la región de la sierra, en donde se registra el mayor aumento del consumo; mientras que la región de la selva es la zona en donde existe menor tendencia al uso de esta droga⁽⁶⁾.

Por esta razón la aplicación del *Método Espectrofotométrico modificado* se eligió a no fumadores y fumadores (reincidentes)⁽⁶⁾ de la ciudad de Lima dentro de una clasificación del consumo máximo en un solo día entre las edades de 12 a 50 años proporcionada por CEDRO⁽⁶⁾.

Distribución de la Toma de Muestra de Fumadores y No Fumadores de la Ciudad de Lima (12-50 años)



Distribución de los Fumadores por sexo y cantidad de cigarrillos consumidos



3.4.2 Nivel de Carboxihemoglobina en No Fumadores de la Ciudad de Lima:

Aplicación del *Método Espectrofotométrico modificado* a la muestra experimental de 11 personas no fumadoras.

Tabla N°28: Nivel de Carboxihemoglobina promedio en No Fumadores de la Ciudad de Lima (12-50 años)

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
14,8	0,4205	0,0818	0,003	0,044	1,326	5,16
13,5	0,4056	0,0903	0,003	0,044	1,518	6,36
14,3	0,4148	0,0918	0,003	0,042	1,581	6,76
13,0	0,3998	0,1015	0,001	0,039	0,651	0,94
13,0	0,3998	0,1103	0,002	0,04	1,379	5,50
10,1	0,3665	0,1015	0,002	0,033	1,679	7,37
11,5	0,3826	0,0938	0,001	0,032	0,766	1,66
14,0	0,4113	0,1168	0,001	0,041	0,693	1,20
12,4	0,3929	0,0993	0,002	0,037	1,366	5,41
10,7	0,3734	0,1085	0,001	0,024	1,211	4,44
10,8	0,3745	0,0618	0,002	0,025	1,320	5,13

% HbCO promedio en No Fumadores = 1,226 ± 29,445%

Desviación Estándar = 0,361

% Coeficiente de Variación = 29,445

Monóxido de Carbono (ppm) = 4,54 ± 49,78%

Desviación Estándar = 2,26

% Coeficiente de Variación = 49,78

Discusión de Resultados:

El nivel de carboxihemoglobina promedio ($\%HbCO$) de la muestra de no fumadores de **1,226** resulta 2,5 veces mayor que el nivel generado por la producción endógena y este exceso puede atribuirse al resultado de la contaminación ambiental al que han estado expuestos los donantes, muestras analizadas de no fumadores en ciudades de Estados Unidos⁽²⁹⁾ indican porcentajes promedios que varían entre **1,2 hasta 2,0** (*Tabla N°7*) en función de la localidad, los niveles mayores pertenecen a grupos relacionados con vehículos y a actividades industriales de combustión. Este nivel de la muestra de no fumadores trata de reflejar un promedio de la contaminación de la **Ciudad de Lima**.

El nivel de carboxihemoglobina promedio hallado en no fumadores ($\%HbCO$) se relaciona mediante la ecuación de Stoker-Seager⁽³⁰⁾ para determinar la concentración en ppm del CO ambiental en equilibrio:

$$\% HbCO \text{ en Sangre} = 0,16 \times [\text{Concentración de } CO \text{ del Aire en ppm}] + 0,5$$

Resulta una concentración promedio de CO ambiental de la Ciudad de Lima de **4,54 ppm**. Este valor no indica ningún efecto significativo sobre la salud según los datos teóricos (*Tabla N°5*).

3.4.3 Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de la Ciudad de Lima:

Aplicación del *Método Espectrofotométrico modificado* a la muestra de 30 fumadores.

Características: Donantes de la Ciudad de Lima

Donantes entre 12 y 50 años

Tabla N°28: Nivel de Carboxihemoglobina promedio en Fumadores de 1 cigarrillo = 9 personas (31,1%)

3 hombres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
12,8	0,3975	0,0625	0,002	0,0193	1,629	7,06
14,2	0,4136	0,106	0,002	0,0313	1,638	7,11
14,2	0,4136	0,092	0,002	0,026	1,711	7,57

% HbCO promedio en Fumadores = 1,659 ± 2,711%

Masculino 1 cigarrillo

Desviación Estándar = 0,045

% Coeficiente de Variación = 2,711

Monóxido de Carbono (ppm) = 7,25 ± 3,88%

Desviación Estándar = 0,28

% Coeficiente de Variación = 3,88

6 mujeres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
12,4	0,3929	0,0625	0,002	0,0223	1,427	5,79
10,6	0,3722	0,072	0,002	0,0237	1,632	7,08
11,3	0,3803	0,06	0,002	0,0197	1,602	6,89
10,0	0,3653	0,0565	0,002	0,0177	1,748	7,80
11,7	0,3849	0,076	0,002	0,023	1,717	7,61
12,3	0,3918	0,0955	0,002	0,035	1,393	5,58

% HbCO promedio en Fumadores = 1,586 ± 9,281%

Femenino 1 cigarrillo

Desviación Estándar = 0,147

% Coeficiente de Variación = 9,281

Monóxido de Carbono (ppm) = 6,79 ± 13,58%

Desviación Estándar = 0,92

% Coeficiente de Variación = 13,58

Tabla N°29: Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de 2 cigarrillos = 5 personas (16,2%)

2 hombres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
14,6	0,4182	0,132	0,002	0,039	1,619	6,99
15,8	0,4320	0,084	0,0023	0,0253	1,768	7,92

% HbCO promedio en Fumadores = 1,693 ± 6,222%

Masculino 2 cigarrillos

Desviación Estándar = 0,105

% Coeficiente de Variación = 6,222

Monóxido de Carbono (ppm) = 7,46 ± 8,83%

Desviación Estándar = 0,66

% Coeficiente de Variación = 8,83

3 mujeres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
12,0	0,3883	0,066	0,002	0,022	1,545	6,53
11,6	0,3837	0,064	0,002	0,0173	1,928	8,93
12,7	0,3964	0,072	0,002	0,0203	1,790	8,06

% HbCO promedio en Fumadores = 1,754 ± 11,056%

Femenino 2 cigarrillos

Desviación Estándar = 0,194

% Coeficiente de Variación = 11,056

Monóxido de Carbono (ppm) = 7,84 ± 15,5%

Desviación Estándar = 1,22

% Coeficiente de Variación = 15,5

Tabla N°30: Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de 5 cigarrillos = 8 personas (26,5%)

4 hombres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
13,8	0,4090	0,1205	0,003	0,041	2,156	10,35
13,7	0,4079	0,114	0,003	0,04	2,096	9,98
11,7	0,3849	0,087	0,003	0,0207	3,276	17,35
16,0	0,4343	0,128	0,003	0,046	1,922	8,89

% HbCO promedio en Fumadores = $2,363 \pm 26,12\%$

Masculino 5 cigarrillos

Desviación Estándar = 0,617

% Coeficiente de Variación = 26,12

Monóxido de Carbono (ppm) = $11,64 \pm 33,11\%$

Desviación Estándar = 3,86

% Coeficiente de Variación = 33,11

4 mujeres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
13,1	0,4010	0,121	0,003	0,036	2,515	12,59
12,5	0,3941	0,0919	0,003	0,0364	1,922	8,89
10,4	0,3699	0,098	0,003	0,0267	2,977	15,48
11,1	0,3780	0,0812	0,003	0,0308	2,093	9,95

% HbCO promedio en Fumadores = $2,377 \pm 19,834\%$

Femenino 5 cigarrillos

Desviación Estándar = 0,471

% Coeficiente de Variación = 19,834

Monóxido de Carbono (ppm) = $11,73 \pm 25,12\%$

Desviación Estándar = 2,95

% Coeficiente de Variación = 25,12

Tabla N°31: Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de 10 cigarrillos=5 personas (15,8%)

3 hombres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
14,0	0,4113	0,132	0,004	0,04	3,209	16,93
15,0	0,4228	0,1202	0,004	0,0368	3,090	16,19
14,0	0,4113	0,13	0,004	0,0382	3,310	17,56

% HbCO promedio en Fumadores = 3,203 ± 3,429%

Masculino 10 cigarrillos

Desviación Estándar = 0,11

% Coeficiente de Variación = 3,429

Monóxido de Carbono (ppm) = 16,89 ± 4,06%

Desviación Estándar = 0,69

% Coeficiente de Variación = 4,06

2 mujeres

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
11,6	0,3837	0,064	0,002	0,0173	1,928	8,93
12,7	0,3964	0,072	0,002	0,0203	1,790	8,06

% HbCO promedio en Fumadores = 1,859 ± 5,27%

Femenino 10 cigarrillos

Desviación Estándar = 0,098

% Coeficiente de Variación = 5,27

Monóxido de Carbono (ppm) = 8,49 ± 7,21%

Desviación Estándar = 0,61

% Coeficiente de Variación = 7,21

Tabla N°32: Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de 20 cigarrillos = 2 personas (7,4%)

1 hombre

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
14,1	0,4125	0,152	0,004	0,037	3,984	21,78

1 mujer

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
14,1	0,4125	0,143	0,004	0,037	3,748	20,30

Masculino 20 cigarrillos

% HbCO promedio en Fumadores = 3,984

Monóxido de Carbono (ppm) = 21,78

Femenino 20 cigarrillos

% HbCO promedio en Fumadores = 3,748

Monóxido de Carbono (ppm) = 20,30

Tabla N°33: Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de 40 cigarrillos = 1 personas (1,9%)

1 hombre

Hb g/100mL	Altura óptica máxima ho	Altura óptica h	Diferencia óptica mínima do	Diferencia óptica d	%HbCO	CO (ppm)
13,8	0,4090	0,163	0,004	0,034	4,689	26,18

Masculino 40 cigarrillos

% HbCO promedio en Fumadores = 4,689

Monóxido de Carbono (ppm) = 26,18

Tabla N°34: Nivel de Carboxihemoglobina en Fumadores de la Ciudad de Lima (12-50 años)

<i>Cantidad de cigarrillos</i>	<i>Nivel de carboxihemoglobina promedio %HbCO ± coeficiente de variación</i>	<i>CO promedio ppm ± coeficiente de variación</i>
1 cigarrillo	<i>Masculino = 1,659 ± 2,711% Femenino = 1,586 ± 9,281%</i>	<i>Masculino = 7,25 ± 3,88% Femenino = 6,79 ± 13,58%</i>
2 cigarrillos	<i>Masculino = 1,693 ± 6,222% Femenino = 1,754 ± 11,056%</i>	<i>Masculino = 7,46 ± 8,83% Femenino = 7,84 ± 15,5%</i>
5 cigarrillos	<i>Masculino = 2,363 ± 26,12% Femenino = 2,377 ± 19,834%</i>	<i>Masculino = 11,64 ± 33,11% Femenino = 11,73 ± 25,12%</i>
10 cigarrillos	<i>Masculino = 3,203 ± 3,429% Femenino = 1,859 ± 5,27%</i>	<i>Masculino = 16,89 ± 4,06% Femenino = 8,49 ± 7,21%</i>
20 cigarrillos	<i>Masculino = 3,984 Femenino = 3,748</i>	<i>Masculino = 21,78 Femenino = 20,30</i>
40 cigarrillos	<i>Masculino = 4,689</i>	<i>Masculino = 26,18</i>

Discusión de Resultados:

Los niveles de carboxihemoglobina promedio (*%HbCO*) de la muestra de fumadores de la Ciudad de Lima se dan en función del número de cigarrillos fumados y trata de reflejar el grado de contaminación por monóxido de carbono durante el hábito de fumar. Estudios en diversas ciudades de los Estados Unidos de fumadores se presentan en la *Tabla N°35⁽²⁹⁾*

Tabla N°35: Porcentaje de *HbCO* en Fumadores de cigarrillos

Localidad	Hasta ½ Cajetilla al día	½ - 1 Cajetilla al día	1 Cajetilla al día	1 ½ Cajetilla al día	2 Cajetillas al día
Milwaukee	3,0	4,2	5,3	6,2	4,7
Nee Hampshire, Vermont	3,3	4,4	5,7	6,7	5,3
New York City	3,1	4,3	4,7	5,8	6,3
Washington, DC	3,8	4,6	5,2	5,8	6,6
Los Ángeles	4,0	5,2	6,0	7,4	7,5
Chicago	4,8	5,4	6,3	7,1	7,7

Los resultados en nuestro caso (*Tabla N°34*) muestran niveles un poco menores que los encontrados en los fumadores de las ciudades de Estados Unidos, esto se puede explicar por las diferencias en la capacidad de saturación de los alvéolos, la forma de fumar y las marcas de cigarrillos que tienen composición variable de tabaco, también a que la muestra experimental tomada de la Ciudad de Lima no es estadísticamente representativa y solo se puede dar un nivel de aproximación.

Los %HbCO promedio hallados en los fumadores de la Ciudad de Lima se relaciona con la ecuación de *Stoker-Seager*⁽³⁰⁾ para determinar la concentración en ppm del CO ambiental en equilibrio:

$$\% \text{ HbCO en Sangre} = 0,16 \times [\text{Concentración de CO del Aire en ppm}] + 0,5$$

Este CO ambiental es el promedio al que ha estado expuesto el fumador con el consumo de cigarrillos.

Se encuentra que con el consumo de **1 y 2 cigarrillos** los niveles de carboxihemoglobina comienzan a presentar **efectos sobre la salud** (*Tabla N°5*) como cambios funcionales cardiacos y pulmonares hasta llegar a efectos sobre el sistema nervioso central con el aumento de la cantidad de cigarrillos. En fumadores de **1 cajetilla (20 cigarrillos)** se alcanza una concentración promedio de **20,30 ppm de CO** que si son fumados durante 8 horas alcanzarían el límite permisible establecido en el Perú por DIGESA y por INAPMAS.

Según la encuesta realizada a los 30 fumadores de la Ciudad de Lima se ha buscado otras variables para ver si influyen o no en el nivel de carboxihemoglobina y se presentan en la *Tabla N°36*.

Tabla N°36: Variables que afectan o no en la encuesta realizada a los Fumadores

Variable	Resultado	Observaciones
<i>Sexo, Edad, Talla y Peso</i>	No influyen	-
<i>Hb (g/100 mL)</i>	Influye	A menor <i>Hb</i> mayor % <i>HbCO</i> , es decir más fácilmente se contamina. Todas las variables que influyan en la <i>Hb</i> influyen
<i>Caja torácica (cm)</i>	Influye	A menor caja torácica mayor % <i>HbCO</i> , es decir cuanta menor facilidad de respirar (se ventila) se contamina más fácilmente
<i>Zonas de alto tráfico en ocupación y residencia</i>	Influye	Estas zonas tienen influencia positiva en el % <i>HbCO</i> por la concentración mayor en el <i>CO</i> ambiental.
<i>Marcas de cigarrillos</i>	-	Mayor consumo: <ul style="list-style-type: none"> • Winston ligh: 45% • Hamilton ligh: 40% • Marboro ligh: 2% • Otros: Premier, mentolados: 2%
<i>Dolencias frecuentes</i>	-	La mayoría declara no tener dolencia, sobre los que sí tienen se presenta: <p>Mayor dolencia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bronquiales o enfermedades respiratorias • Cansancio o bajo rendimiento físico • Sistema nervioso.

3.5 Determinación por Tubos Colorimétricos de la concentración de CO (ppm): ^(24,33)

3.5.1 Medición de CO en un ambiente interior expuesto al humo de cigarrillos:

Se mide por la técnica de los Tubos Colorimétricos el CO que proviene del humo de 2, 4 y 6 cigarrillos para asemejar el aire contaminado al que está expuesto el fumador y las personas de su alrededor que son llamadas “*fumadores pasivos*”.

A partir de la concentración de CO en el aire contaminado se obtiene el porcentaje de carboxihemoglobina, esto permite relacionar el Método de los Tubos Colorimétricos con el Método Espectrofotométrico modificado.

Tabla N°39: Medición experimental de ppm del CO en el humo de cigarrillos Winston light

Número de cigarrillos	CO (ppm) experimental	CO (ppm) referencial	Tiempo de duración de los cigarrillos (min)
2	4,2	1,9 – 3,9	28
4	6,3	3,9 – 7,8	56
6	7,1	5,8 – 11,6	84
<i>Dilución natural después de 30 min.</i>	3,1	–	–

Con estas concentraciones de CO hallado se calcula el nivel de carboxihemoglobina por la ecuación de *Stoker-Seager*⁽³⁰⁾

$$\% \text{HbCO en Sangre} = 0,16 \times [\text{Concentración de CO del Aire en ppm}] + 0,5$$

Tabla N°40: Nivel de Carboxihemoglobina calculado a partir del CO en el humo de cigarrillos *Winston light* por el Método de los Tubos Colorimétricos

Número de cigarrillos	CO (ppm) experimental	%HbCO <i>Método Tubos Colorimétricos</i>
2	4,2	1,172
4	6,3	1,508
6	7,1	1,636
<i>Dilución natural de 6 cigarrillos después de 30 min.</i>	3,1	0,996

Discusión de Resultados:

La toma de muestra se realiza en un *interior* (ambiente cerrado) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en el Área de Química de 13,2012 m³ a 30 cm de altura y 50 cm de largo de la fuente: humo del cigarrillo *Winston light*, que según la encuesta realizada a los fumadores resulta la marca de mayor consumo. Se escoge este punto para asemejar el aire contaminado al que está expuesto el fumador y las personas de su alrededor.

Se muestrea (*Anexo N°6 y 7*) progresivamente el aire en equilibrio con el humo de 2 cigarrillos (al instante en que consumen los cigarrillos), luego con 4 cigarrillos, 6 cigarrillos y por último se mide después de media hora del último cigarrillo (*2.5.1. Medición de CO en un ambiente interior expuesto al humo de cigarrillos*). Se hace la medición hasta 6 cigarrillos porque según CEDRO el mayor porcentaje de fumadores de la Ciudad de Lima consume de 3 a 5 cigarrillos y el nivel de carboxihemoglobina promedio en fumadores de 5 cigarrillos presenta efectos sobre la salud.

Esta medición nos da la concentración de CO experimental y con la concentración referencial de CO del humo de cigarrillos en ambientes interiores⁽³³⁾ se puede relacionar.

Concentración Referencial⁽³³⁾ de CO del humo de cigarrillo en un interior:

25000 – 50000 ug CO/cigarrillo

Como el cigarrillo es prendido en el interior, el humo ocupa el volumen total.

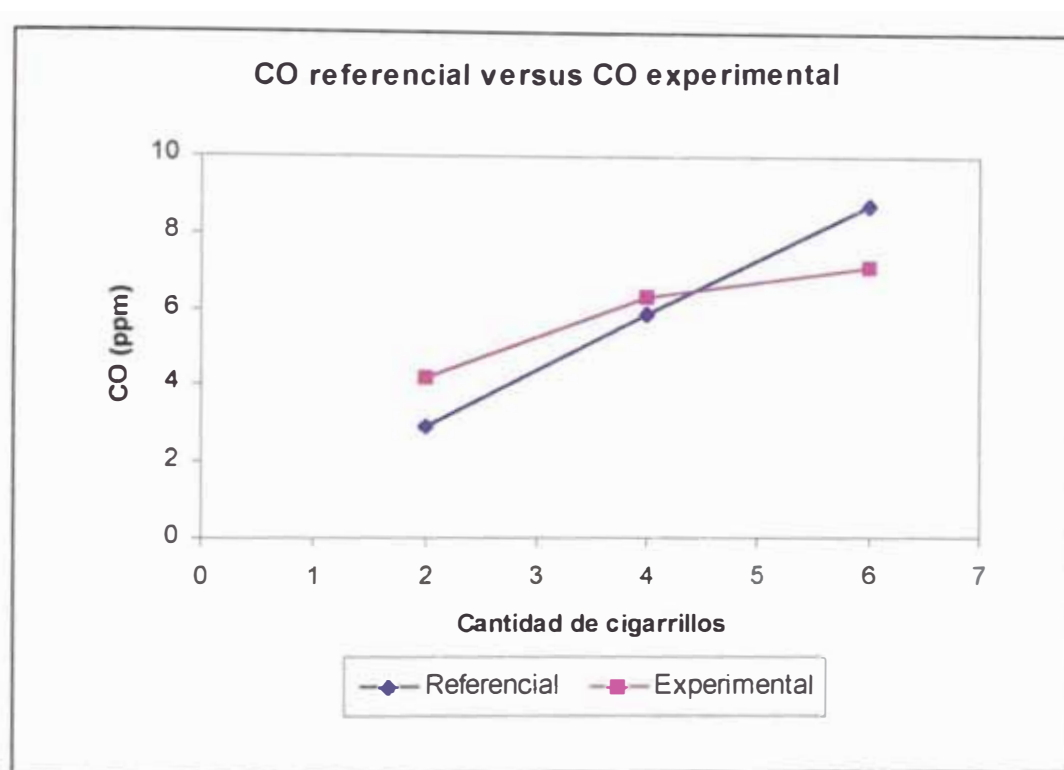
$$25000 - 50000 \text{ ug CO} / 13,2012 \text{ m}^3 \text{ (Volumen del interior)}$$

A condiciones normales: $CO \text{ (ppm)} = CO \text{ (ug/m}^3) \times 24,6 \times 10^{-3} / \text{Peso molecular CO}$

Peso Molecular CO = 48 g/mol

Los valores de *CO* referenciales al humo de 2, 4 y 6 cigarrillos se encuentran en la *Tabla N°39*. Se toman los valores promedio de ellos y se grafican junto con los valores de *CO* experimentales.

Gráfico N°4: Valores de *CO* referenciales y experimentales del humo de cigarrillos



Según el gráfico hay una desviación experimental por el método de Tubos Colorimétricos al aumentar el número de cigarrillos, por lo cual solo medimos hasta 6 cigarrillos en que consideramos que se aproximan a los valores referenciales (*Tabla N°39*).

La dilución natural del interior de 6 cigarrillos después de 30 minutos indica que el nivel de *CO* disminuyó en un 61% y el porcentaje de carboxihemoglobina que puede alcanzar valores menores al 1% que no tienen efectos significativos sobre la salud, esto se explica por la reversibilidad de la *HbCO* y la *HbO₂*.

A partir del *CO* del interior que proviene del humo de cigarrillos se ha calculado el nivel de carboxihemoglobina a través de la ecuación de *Stoker-Seager*⁽³⁰⁾ (*Tabla N°40*) y de esta forma se puede relacionar el *Método de los Tubos Colorimétricos* para *CO* ambiental con el *Método Espectrofotométrico modificado* para %*HbCO*. Este nivel de *HbCO* puede ser alcanzado por personas que se encuentran en el mismo ambiente interior, llamados “fumadores pasivos”. Se muestra esta relación en la *Tabla N°41*.

Tabla N°41: Relación del Nivel de Carboxihemoglobina por el Método de Tubos Colorimétricos y por el Método Espectrofotométrico modificado.

Número de cigarrillos	% <i>HbCO</i> Método Tubos Colorimétricos	% <i>HbCO</i> Método Espectrofotométrico modificado
2	1,172	Fumadores de 2 cigarrillos: Masculino = 1,693 Femenino = 1,754 Promedio = 1,724
4	1,508	Fumadores de 5 cigarrillos: Masculino = 2,363 Femenino = 2,377 Promedio = 2,37
6	1,636	Fumadores de 5 cigarrillos: Masculino = 2,363 Femenino = 2,377 Promedio = 2,37

Comparando los datos obtenidos por el método de los tubos colorimétricos y la ecuación de *Stoker-Seager*⁽³⁰⁾ con los obtenidos por el método espectrofotométrico modificado se determina que los porcentajes de carboxihemoglobina se relacionan en un 70%. La aproximación por tubos colorimétricos mide %*HbCO* menores que el método espectrofotométrico modificado. Esta diferencia en los valores se debe a que la fuente del humo no es directa en las personas que se encuentran en el mismo ambiente interior y también está de acuerdo con el margen de exactitud que los tubos colorimétricos tienen ($\pm 25\%$) (*Anexo N°7*).

Estos niveles de *CO* en un ambiente interior atribuidos al humo de cigarrillos afecta a las personas no fumadoras (*fumadores pasivos*) que comparten el ambiente con los fumadores y advierte el riesgo que corren en aumentar su nivel de carboxihemoglobina.

Resumen de Resultados Experimentales

1. La aplicación del método espectrofotométrico modificado en una muestra de 11 personas *no fumadoras* de la Ciudad de Lima indica un *nivel de carboxihemoglobina promedio (%HbCO) de 1,226 que equivale a 4,54 ppm de monóxido de carbono ambiental promedio.*
2. La aplicación del método espectrofotométrico modificado en una muestra de 30 personas *fumadoras* de la Ciudad de Lima permite dar niveles de carboxihemoglobina promedio (%HbCO), *1,623 para 1 cigarrillo; 1,724 para 2 cigarrillos; 2,37 para 5 cigarrillos; 2,531 para 10 cigarrillos; 3,866 para 20 cigarrillos y 4,689 para 40 cigarrillos.* Se encuentra que con el consumo de *1 y 2 cigarrillos* ya se presentan *efectos sobre la salud.*
3. Según la encuesta realizada a la muestra de las 30 personas fumadoras se encuentra que las *variables* que no influyen en el %HbCO son sexo, edad, talla y peso; las que parecen influir directamente *son el nivel de hemoglobina en la sangre, la capacidad de oxigenarse (caja torácica) y las zonas de alto tráfico* del lugar de residencia y/o de ocupación.

Sugerencias

- Para obtener valores propios verificando la Ecuación de Stoker-Seager que relaciona directamente la carboxihemoglobina y el monóxido de carbono ambiental se sugiere el empleo de *atmósferas normalizadas*. Experimentalmente se ha logrado una modificación al Método Espectrofotométrico para no emplear atmósfera de CO basada en un rango de linealidad donde se cumple el método espectrofotométrico descrito por la OMS, pero disminuye el tiempo de duración del análisis y evita el uso del sistema de atmósferas normalizadas que requieren instrumental adecuado y específico.
- Para determinar las *variables que influyen en el nivel de carboxihemoglobina* y establecer sus consecuencias se sugiere realizar un estudio estadístico. No se ha

realizado un estudio estadístico porque es difícil tener las muestras de sangre de fumadores representativos y libres de cualquier tipo de enfermedad, que pueda enmascarar los resultados experimentales. Los donantes de sangre son cada vez menos por los problemas actuales de contaminación de enfermedades, siendo algunas incurables como el SIDA.

- Para explicar los resultados de carboxihemoglobina endógena y el atribuido a la producción exógena de las ciudades se sugiere evaluar la *contaminación ambiental* con monóxido de carbono.

4 CONCLUSIONES

Se verifica el *Método Espectrofotométrico* de medición del *CO* sanguíneo con los espectros visibles de la hemoglobina (*Hb*), la oxihemoglobina (*HbO₂*) y la carboxihemoglobina (*HbCO*) que permiten definir las longitudes de onda experimentales. El *Método de la Metacianohemoglobina* permite presentar el *Método Espectrofotométrico modificado* basado en la *linealidad* de la curva que relaciona proporcionalmente la cantidad de hemoglobina con el nivel de saturación con *CO* de la misma muestra de sangre, fijando un rango de aplicación experimental.

La *modificación experimental* propuesta se basa en la estabilidad de los complejos *HbCO* y *HbCN* que aseguran un acomplejamiento total, siendo el *CO* y *CN* ligandos que tienen similar fuerza de campo por la *Serie Espectroquímica*. La ventaja de esta modificación consiste en que se usa soluciones acuosas de los complejos sin el requerimiento de atmósferas normalizadas y se disminuye el tiempo de análisis.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AB Chimica Laboratorios S.A.**; Manual de Métodos: “*Método de la Metacianohemoglobina para la determinación de la Hemoglobina*”; Perú; 1997; 2 páginas.
2. **AKLAND, G., et al.**; “*Measuring Human Exposure to Carbon Monoxide in Washington, D.C., and Denver, Colorado, during the Winter of 1982-1983*” *Environmental Science Technology* 19 (10): 911-918, 1985.
3. **BARÁN, Enrique J.**; “*Química Bioinorgánica*”; Editorial McGraw-Hill S.A.; España; 1995; páginas 11-25, 61-66, 88-90,95-102.
4. **BRAVO, Humberto**; “*La Contaminación del Aire en México*”; 1º edición; Editorial Universo Veintiuno; México; 1987; páginas 43-47,59,183-185.
5. **BUTLER I. y HARROD, J.**; “*Química Inorgánica. Principios y Aplicaciones*”; Editorial Addison-Wesley Iberoamericana; USA; 1992; páginas 726-734.
6. **CEDRO (DEL CENTRO DE INFORMACIÓN Y EDUCACIÓN PARA LA PREVENCIÓN DEL ABUSO DE DROGAS) ROJAS, M. – CASTRO, R.**; “*Epidemiología de Drogas en la Población Urbana Peruana-1995*” Monografía de Investigación N°15; Perú; 1997; páginas 21-51, 77-100.
7. **CENTRO PANAMERICANO DE ECOLOGÍA HUMANA Y SALUD. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**; Lecturas complementarias “*Nociones Básicas de Toxicología*”; 1985; páginas 264-285.
8. **CHIARELLA, Gina**; “*Apuntes sobre Química Bionorgánica*”; Curso de Química Inorgánica IV; Escuela Profesional de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería; Perú; 1999; 39 páginas.
9. **COTTON, A. y WILKINSON, J.**; “*Química Inorgánica Avanzada*”; Editorial Limusa S.A.; México; 1990; páginas 1567-1579.
10. **COTTON, A. y WILKINSON, J.**; “*Química Inorgánica Básica*”; Editorial Limusa S.A.; México; 1991; páginas 539-553.
11. **DA SILVA, F. and WILLIAMS, R.**; “*The Biological Chemistry of the Elements*” *The Inorganic Chemistry of Life*; Press; USA; 1991; páginas 343-353.
12. **DÍAZ, Mercedes**; “*Determinación Espectrofotométrica del Efecto de Ligandos Carbonilo CO y Nitrosilo NO en el Hierro Fe⁻² de la Hemoglobina de la Sangre*” Proyecto de Tesis I; Escuela Profesional de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería; Perú; 1995; 138 páginas.

13. **DÍAZ, Mercedes**; “*Determinación Espectrofotométrica del Efecto de Ligandos Carbonilo (CO), Nitrosilo (NO) e Hidrógeno Sulfurado (H₂S) en la Hemoglobina de la Sangre*” Proyecto de Tesis II; Escuela Profesional de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería; Perú; 1995; 86 páginas.
14. **DICKSON, T.**; “*Química*” Enfoque ecológico: 4° edición; Editorial Limusa S.A.; México; 1990; páginas 173-177, 180-182, 191-194.
15. **DOUGLAS, B.; McDANIEL, D. y ALEXANDER, J.**; Conceptos y Modelos de “*Química Inorgánica*”; 2° edición; Editorial Reverté S.A.; España; 1987; páginas 698-704.
16. **DREISBACH, R. y ROBERTSON, W.**; “*Manual de Toxicología Clínica*” Prevención, Diagnóstico y Tratamiento; 6° edición; Editorial El Manual Moderno S.A.; México; 1988; páginas 240-243.
17. **FALEN, Juan**; “*Manual de Laboratorio Clínico*” Serie: Documento de Trabajo N°20; Dirección de Investigación de la Universidad Nacional Federico Villarreal; 1983; páginas 86-87.
18. **GAMBOA, Nadia**; “*Muestreo y Análisis de Contaminantes en Aire y Agua*” XX Congreso Peruano de Química. II Simposio Peruano Química y Medio Ambiente. Sociedad Química del Perú. Expositor. Del 13 al 17 de Octubre de 1997.
19. **HUHEEY, James**; “*Química Inorgánica*”; Editorial Harla S.A.; 2° edición; México, 1981; páginas 783-803.
20. **KAIN, W. and SCHWEDERSKI, B.**; “*Bioinorganic Chemistry*” Inorganic Elements in the Chemistry of Life; John Wiley and Sons; England; 1994; páginas 88-100.
21. **KIRK, R. y OTHMER, D.**; “*Enciclopedia de Tecnología Química*”; tomo XI y XIV; Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana UTEHA; México; 1962; páginas 735-744 (XI), 943-962 (XIV).
22. **KOLMER, R.**; “*Métodos de Laboratorio*”; 5ª edición; Editorial Interamericana; Inglaterra; 1960; páginas 1068-1071.
23. **MALENFANT, A., et al.**; “*Spectrophotometric determination of hemoglobin concentration and percent oxyhemoglobin and carboxyhemoglobin saturation*” *Clinical Chemical* 14 (8): 789, 1968.
24. **MANUAL SENSIDYNE**; “*Tubos Detectores Sensidyne*”; Sensidyne, Inc.; Copyright 1984.

25. **OCHIAI, Ei-Ichiro**; “*Química Bioinorgánica*” Una Introducción; Editorial Reverté S.A.; España; 1985; páginas 10-13, 81-122, 261-267.
26. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, GINEBRA**; “*Selección de Procedimientos para medir la Contaminación del Aire*”; Suiza, OMS 1976; Publicación en Offset N°24; páginas 49-77.
27. **PACHAS, Mélida**; “*Salud Ocupacional*”; Vol XIII N°1-2; Revista del Instituto de Salud Ocupacional. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social; Impreso en Perú; 1968; páginas 17-27.
28. **SOTO, G. – MÁRQUEZ, T. – ADAMS, R.**; “*Niveles de Carboxihemoglobina en la Población de Puebla y sus implicancias*” *Salud Pública de México*, XXIII, 399-403, 1981.
29. **STEWART, R., et al.**; “*Carboxyhemoglobin Levels in American Blood Donors*” *Journal of the American Medical Association* 229 (9): 1187-1195, 1974.
30. **STOKER, H. – SEAGER, S.**; “*Química Ambiental*” Contaminación del Aire y del Agua; Editorial Blume; España; 1981; páginas 11-19, 21-65.
31. **THORPE, W. – BRAY, G.** “*Bioquímica*”; 9° edición; Compañía Editorial Continental S.A.; México; 1974; páginas 216-229, 436.
32. **VILLANÚA, León**; “*Toxicología*”; 2° edición; Publicaciones del departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado (Facultad de Farmacia. Universidad Complutense); España; 1982; páginas 191-205.
33. **WADDEN, R. – SCHEFF, P.**; “*Contaminación del Aire en Interiores*”; Editorial Limusa; México; 1987; páginas 25-40, 73-83.