

TIOCIANATO URINARIO EN FUMADORES Y NO FUMADORES UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR VISIBLE

URINARY THIOCYANATE IN SMOKERS AND NON-SMOKERS USING VISIBLE MOLECULAR ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

Pedro Matheus Romero¹, Luisa Barboza Carrillo², Liset Castillo Peña¹, Keila Rivas Rodríguez¹

¹Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control.

²Cátedra de Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Universidad de Los Andes. Mérida 5101-Venezuela. Email: pmateus@ula.ve

Recibido: 07-04-2024

Aceptado: 26-04-2024

RESUMEN

Se realizó la determinación de los niveles de tiocianato en muestras de orina matinal de individuos fumadores y no fumadores, para lo cual fueron analizadas 151 muestras de orina de individuos elegidos al azar (65 hombres y 86 mujeres) en edades comprendidas entre 18 y 68 años, con edad promedio de 29,71 años, pertenecientes a una población de estudiantes y trabajadores del Municipio Libertador del Estado Mérida-Venezuela mediante Espectrofotometría visible, utilizando el método del papel picrato desarrollado por Bradbury y colaboradores.¹ Las curvas de calibración fueron construidas con diferentes patrones de tiocianato de Potasio (4,0; 8,0; 12,0; 16,0 y 20,0 µg/mL), obteniendo una buena regresión lineal igual a 0,9968. De un total de 151 muestras de orina analizadas, 48 corresponden a individuos fumadores (23 activos y 25 pasivos) y 103 a individuos no fumadores. Los resultados obtenidos muestran que el 47,9 % de los individuos fumadores y el 25,8 % de los individuos no fumadores presentan niveles de tiocianato superiores a los valores normales, lo que indica que el consumo de cigarrillo aumenta los niveles de tiocianato en orina matinal. En algunos individuos fumadores se encontraron niveles de tiocianato entre 8 y 10 veces por encima de los valores normales. Al comparar los valores obtenidos en fumadores activos y fumadores pasivos, se observa que ambos grupos presentan niveles de tiocianato por encima de los valores normales, 52,8 % y 46,5 % respectivamente, siendo el porcentaje ligeramente mayor para los fumadores activos

Palabras clave: Orina matinal, tiocianato, fumadores pasivos, fumadores activos, Espectrofotometría Molecular Visible.

Pedro Matheus Romero: Dr por la Universidad Autónoma de Madrid dentro del Programa de “Tendencias Actuales en Química Inorgánica y Avanzada”. España. MSc en Química Aplicada, Mención Electroquímica. Universidad de Los Andes ULA Venezuela. Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A) por la Universidad Autónoma de Madrid dentro del Programa de “Tendencias Actuales en Química Inorgánica y Avanzada” España. Personal docente y de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

Luisa Barboza Carrillo: Dra en Biología Celular. Universidad de Los Andes ULA Venezuela. MSc en Inmunología. ULA Venezuela. Personal docente y de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

Liset Castillo Peña: Licenciada en Bioanálisis ULA.

Keila Rivas Rodríguez: Licenciada en Bioanálisis ULA.

URINARY THIOCYANATE IN SMOKERS AND NON-SMOKERS USING VISIBLE MOLECULAR ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

Pedro Matheus Romero¹, Luisa Barboza Carrillo², Liset Castillo Peña¹, Keila Rivas Rodríguez¹

¹Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control.

²Cátedra de Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Universidad de Los Andes. Mérida 5101-Venezuela. Email: pmateus@ula.ve

Recibido: 07-04-2024

Aceptado: 26-04-2024

ABSTRACT

Thiocyanate levels were determined in morning urine samples from smokers and nonsmokers, for which 151 urine samples from randomly selected individuals (65 men and 86 women) between the ages of 18 and 68 were analyzed, with an average age of 29,71 years, belonging to a population of students and workers from the Libertador Municipality of the State of Mérida-Venezuela by means of visible Spectrophotometry, using the picrate paper method developed by Bradbury et al.¹ The calibration curves were built with different potassium thiocyanate standards (4,0; 8,0; 12,0; 16,0 and 20,0 µg/mL), obtaining a good linear regression equal to 0,9968. Of a total of 151 urine samples analyzed, 48 correspond to smokers (23 actives and 25 passives) and 103 to non-smokers. The results obtained show that 48,7% of smokers and 25,8% of non-smokers have thiocyanate levels above normal values, indicating that cigarette smoking increases thiocyanate levels in morning urine. In some smoking individuals, thiocyanate levels were found between 8 and 10 times above normal values. When comparing the values obtained in active smokers and passive smokers, it is observed that both groups present thiocyanate levels above normal values, 52,8% and 46,5% respectively, the percentage being slightly higher for active smokers.

Key words: Morning urine, thiocyanate, passive smokers, active smokers, Visible Molecular Spectrophotometry.

Pedro Matheus Romero: Dr por la Universidad Autónoma de Madrid dentro del Programa de “Tendencias Actuales en Química Inorgánica y Avanzada”. España. MSc en Química Aplicada, Mención Electroquímica. Universidad de Los Andes ULA Venezuela. Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A) por la Universidad Autónoma de Madrid dentro del Programa de “Tendencias Actuales en Química Inorgánica y Avanzada” España. Personal docente y de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

Luisa Barboza Carrillo: Dra en Biología Celular. Universidad de Los Andes ULA Venezuela. MSc en Inmunología. ULA Venezuela. Personal docente y de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

Liset Castillo Peña: Licenciada en Bioanálisis ULA.

Keila Rivas Rodríguez: Licenciada en Bioanálisis ULA.

Introducción

El tiocianato es el producto principal obtenido en el cuerpo mediante la transformación bioquímica del cianuro, siendo esta la principal vía de desintoxicación. Este proceso ocurre por la biotransformación enzimática mediante la trans-sulfuración de cianuro (CN-) a tiocianato (SCN-), el cual es excretado principalmente por el riñón y es mucho menos tóxico. Aunque en los humanos los tiocianatos son menos dañinos que el cianuro, se sabe que afectan la glándula tiroides, por lo que son considerados compuestos bociógenos, ya que reducen la habilidad de la glándula para producir las hormonas tiroideas T₃ y T₄ que son necesarias para el funcionamiento normal del cuerpo.^{2,3}

Hay evidencias de que numerosos compuestos ambientales contenidos en los alimentos, el agua y el aire (algunos naturales y otros fabricados por el hombre) y ciertos fármacos pueden ser responsables de algunos casos de bocio, actuando directamente sobre la glándula tiroides o afectando sus mecanismos reguladores.⁴

Los bociógenos alimentarios más claramente implicados derivan de vegetales de la familia de las crucíferas (repollo, coliflor, brócoli, rábano, rúcula), que contienen precursores de tiocianato, los cuales inhiben la concentración activa de yodo inorgánico por la tiroides.^{4,5} Por otro lado, el humo del tabaco contiene sustancias precursoras de tiocianato que son absorbidas por el organismo.

Diversos estudios han mostrado un aumento del volumen de la tiroides y de la prevalencia de bocio en personas muy fumadoras. Además, se sabe que el tiocianato atraviesa libremente la barrera placentaria, lo que puede tener implicaciones en la función tiroidea del feto en caso de tabaquismo materno.⁶

En cuanto a la toxicidad, el tiocianato es siete veces menos tóxico que el cianuro, aunque puede afectar la glándula tiroides en concentraciones altas provenientes de una exposición crónica al cianuro. Es sabido que

los valores normales de tiocianato en orina de personas no fumadoras (no expuestas) se encuentran entre 0,10 y 0,40 µg/mL y para personas fumadoras entre 0,15 y 1,70 µg/mL, pudiéndose incluso establecer diferencias entre fumadores activos y fumadores pasivos.

Los individuos se pueden dividir en tres grupos según el grado de exposición tabáquica: fumadores activos (personas expuestas a los componentes del humo del tabaco por consumo activo y voluntario, que fuman 1 o más cigarrillos por día), fumadores pasivos (personas expuestas a los componentes del humo del tabaco de forma involuntaria y cotidiana) y no fumadores (personas que no han tenido contacto con los componentes del humo del tabaco, que nunca han fumado, o han dejado de hacerlo, al menos 1 mes antes de aplicar el cuestionario).

Este último grupo es difícil de encontrar, debido a la casi imposibilidad de estar en algún lugar sin humo de tabaco.⁷

Es importante mencionar que el tiocianato, debido a su baja eliminación de los fluidos corporales y a su larga vida media de hasta 15 días, es un marcador muy útil para estudiar exposiciones crónicas al humo del tabaco.

Aunque el tiocianato no es un marcador específico del consumo de tabaco y que además no se puede medir en pequeñas concentraciones, puede dar una correlación muy aproximada del hábito tabáquico del individuo.

El tiocianato se mantiene detectable en el organismo durante aproximadamente 7 días, metabolizándose en el hígado, riñón e intestino, de modo que su presencia en sangre, orina y saliva hace que sea un parámetro válido para la cuantificación del estado de impregnación de un fumador.

Hay que tener en cuenta que el nivel de tiocianato presente en un individuo puede ser un falso positivo, ya que algunos alimentos contienen cianógeno, que al metabolizarse deriva a tiocianato.⁵

Desarrollo

Se recolectaron 151 muestras de orina de 151 pacientes elegidos al azar pertenecientes a una población de estudiantes y trabajadores del Municipio Libertador del Estado Mérida-Venezuela, en edades comprendidas entre 18 y 68 años, con edad promedio de 29,71 años, 48 muestras de individuos fumadores (23 activos y 25 pasivos) y 103 de individuos no fumadores.

Las muestras consistieron en orina en ayunas (eliminando el primer chorro del día). A los participantes en el estudio se les aplicó un cuestionario relacionado con sus hábitos alimenticios, estilo de vida, antecedentes patológicos, etc. A cada uno se le entregó el recolector de orina y las recomendaciones apropiadas para la toma de muestra, firmando el correspondiente consentimiento jurado como participantes de la investigación.

Materiales y métodos

Las muestras de orina fueron procesadas y analizadas, en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en Mérida-Venezuela. A estas muestras se les observó su aspecto físico y se les midió volumen y pH.

Para la determinación de tiocianato se utilizó el método del papel picrato desarrollado por Bradbury y colaboradores,¹ utilizando Espectrofotometría visible para medir las absorbancias y posteriormente las concentraciones de tiocianato.

Para la preparación de las curvas de calibración (absorbancia vs. concentración), se partió de una solución de 500 µg/mL de KSCN (Riedel-De-Haen Ag, 99% de pureza) en agua ultrapura (18 MΩ), a partir de la cual se preparó una solución de 20,0 µg/mL y de esta se prepararon, por dilución, los patrones (4,0; 8,0; 12,0; 16,0 y 20,0 µg/mL) en alícuotas de 5 mL. Para seleccionar la longitud de onda apropiada, se realizó un barrido espectral desde 460 hasta 560 nm, obteniendo la máxima absorbancia a 510 nm (resultados no presentados en este

artículo).

Las lecturas de los patrones fueron realizadas en un espectrofotómetro Genesys 20 a 510 nm. Una vez construida la curva de calibración, se midieron las respectivas absorbancias a cada una de las muestras de orina previamente tratadas y colocadas en un frasco ámbar durante 30 minutos, para finalmente determinar las concentraciones de tiocianato en cada una de ellas.⁸

Análisis Estadístico

Una vez recolectada la información, esta fue vaciada en una hoja de cálculo utilizando el software Microsoft Office Excel®, seguidamente los datos se exportaron al Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) versión 26, para su procesamiento.

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante estadísticas descriptivas: las variables cualitativas fueron expresadas en frecuencia y porcentaje y, las variables cuantitativas se representaron como media y desviación estándar.

La homogeneidad y normalidad de la muestra se estableció mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.⁹

Los resultados arrojados por esta prueba demostraron que los datos no seguían una distribución normal por lo que se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney¹⁰ para muestras independientes. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$.

Resultados

1. Curva de calibración de tiocianato.

En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos para la curva de calibración del tiocianato (absorbancia vs. concentración en µg/mL), en la que se observa que existe un coeficiente de determinación, $R^2 = 0,9968$, lo que indica que un 99,68% de la variabilidad de la absorbancia corregida, puede atribuirse a una relación lineal con la concentración, por lo que el método

utilizado comprueba la linealidad en el intervalo estudiado (0-20) $\mu\text{g/mL}$.

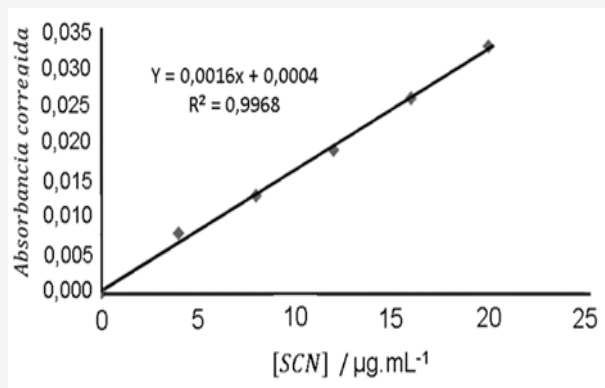


Figura 1. Curva de Calibración de Tiocianato de Potasio (Absorbancia vs Concentración).

En el caso del coeficiente de correlación, $R = 0,9984$, este valor indica que existe una relación lineal directa entre las variables (absorbancia corregida y concentración) y que mientras el valor de R se encuentre más cercano a la unidad, existe una dependencia total directa entre las variables, es decir, si x aumenta, y aumenta en igual proporción, además indica que, como R es positivo, se dice que la correlación es positiva.

Tomando en consideración que el coeficiente de correlación (R) de la regresión lineal debe estar entre 0,98 y 1,00 y el coeficiente de determinación (R^2) debe ser mayor a 0,9511, podemos decir que el intervalo de concentración 0,0 hasta 20,0 $\mu\text{g/mL}$ satisface las condiciones de linealidad del método analítico.

Es importante mencionar que las absorbancias corregidas se refieren a los valores de absorbancia obtenidos cuando se restan la absorbancia del blanco a las absorbancias de cada una de las muestras medidas. Tanto R como R^2 fueron calculados utilizando el programa estadístico Excel 2010.

2. Niveles de Tiocianato en Orina Matinal para individuos fumadores y no fumadores.

Una vez analizadas las muestras de orina y obtenidas las absorbancias de dichas muestras, se procedió a determinar los niveles de tiocianato en cada una de ellas

utilizando la ecuación:

$$C_M \times A_M = C_P \times A_P, \text{ donde:}$$

C_M : Concentración de la muestra;

A_M : Absorbancia de la muestra;

C_P : Concentración del patrón;

A_P : Absorbancia del patrón.

En la Tabla 1 se puede observar que de un total de 151 muestras analizadas el 47,9% de los individuos fumadores presentan niveles de tiocianato por encima de los valores normales [grupo (c) $>1,70 \mu\text{g/mL}$]. Así mismo, el 72,6% de los no fumadores presentan niveles por debajo de los valores normales [grupo (a) $<0,10 \mu\text{g/mL}$].

Los resultados obtenidos para el SCN- confirman los reportados por otros autores^{4,6,7} lo que indica que efectivamente el consumo de cigarrillo eleva los niveles de este ion. Según estos autores, el ion tiocianato generalmente está presente en bajas concentraciones en la orina, el suero y la saliva humana como resultado del consumo de alimentos que contienen glucósidos cianógenos.

Estos estudios sobre SCN- en orina de personas que fuman cigarrillo, demuestran que el consumo de cigarrillo aumenta la concentración de este ion con respecto a las personas no fumadoras. La concentración promedio de tiocianato en orina para los fumadores fue de 0,155 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, en los no fumadores, fue de 0,075 $\mu\text{g/mL}$.

Al comparar los niveles de SCN- entre fumadores y no fumadores, observamos que el porcentaje de fumadores con valores por encima de los valores normales (47,9%) duplica al porcentaje de no fumadores (25,8%).

En este estudio, en algunos individuos se encontraron valores de SCN- entre 8 y 10 veces por encima de los normales. Algunos autores indican, que debido a las concentraciones relativamente altas de SCN- en saliva (aproximadamente 20 veces más altas que en plasma) y la falta de invasividad de la saliva, el SCN- se determina con frecuencia

Tabla 1. Resultados obtenidos en la Determinación de Tiocianato en Orina matinal (fumadores y no fumadores).

	Nº de Muestras	(%)	Niveles de Tiocianato		
			(a)	(b)*	(c)
Fumadores	48	31,8	19 (39,6%)	6 (12,5%)	23 (47,9%)
No fumadores	103	68,2	75 (72,6%)	2 (1,6%)	26 (25,8%)
Total	151	100	94 (62,2%)	8 (5,3%)	49 (32,5%)

(a) Niveles de tiocianato por debajo de los valores normales. (b) Niveles de tiocianato dentro de los valores normales. (c) Niveles de tiocianato por encima de los valores normales. *Los valores normales de SCN⁻ difieren para ambos grupos, fumadores entre 0,15 y 1,70 µg/mL y no fumadores entre 0,10 y 0,40 µg/mL.

en la saliva, sin embargo, varios factores pueden influir en la determinación de SCN⁻ en la saliva, lo que aumenta la variabilidad de este biomarcador en comparación con el SCN⁻ en plasma u orina.¹² Esta es una de las razones por la cual este estudio se realizó en orina, a pesar de que en otro estudio concluyen que el SCN⁻ en la saliva es más estable que el SCN⁻ en plasma u orina.¹³

3. Niveles de Tiocianato en Orina Matinal para fumadores activos y fumadores pasivos.

Los resultados presentados en la Tabla 2 indican que los dos grupos de fumadores, activos y pasivos, representan el mayor

porcentaje de las muestras analizadas, 52,8% y 46,5% respectivamente y que se encuentran clasificadas en el grupo (c), es decir, donde las concentraciones de SCN⁻ se encuentran por encima de los valores normales. También es importante mencionar que, como era de suponer, los niveles de tiocianato son ligeramente superiores para el grupo de fumadores activos, aunque ambos grupos se encuentran con valores por encima de los normales [grupo (c)].

4. Análisis Estadístico.

Tal y como se puede apreciar en la tabla 3, la media (desviación estándar) de la concentración de tiocianato urinario en

Tabla 2. Resultados obtenidos en la Determinación de Tiocianato en Orina matinal (Fumadores Activos y Fumadores Pasivos).

		Niveles de Tiocianato		
		(a)	(b)*	(c)
Fumadores (48)	Activos	23 (47,9%)	8 (35,8%)	3 (11,4%)
	Pasivos	25 (52,1%)	10 (41,4%)	3 (12,1%)

(a) Niveles por debajo de los valores normales. (b) Niveles dentro de los valores normales.

(c) Niveles por encima de los valores normales.

*Los valores normales de SCN⁻ para fumadores oscilan entre 0,15 y 1,70 µg/mL.

Tabla 3. Concentración de tiocianato urinario ($\mu\text{g/ml}$) en los grupos estudiados.

Grupos	N	[SCN ⁻] ($\mu\text{g/mL}$) Media (DE)*
No Fumadores	103	29,12 (5,90)
Fumadores	48	54,92 (12,46)

Valores expresados en media (desviación estándar: DE).

*: $p=0,048$ calculada mediante U de Mann-Whitney.

el grupo de sujetos fumadores fue 54,92 (12,46) $\mu\text{g/mL}$, mientras que en el grupo de no fumadores fue 29,12 (5,90) $\mu\text{g/mL}$, estas diferencias fueron estadísticamente significativas con $p = 0,048$.

Se observa un incremento significativo de las concentraciones de tiocianato urinario en la población fumadora en comparación con la población no fumadora, lo que indica que el tiocianato urinario puede ser empleado como un marcador bioquímico para evaluar el estatus del consumo de tabaco.

Estos hallazgos se asemejan a lo reportado previamente en la literatura.¹⁴⁻¹⁷ Una limitante de este estudio fue que no se pudo analizar la relación entre las concentraciones de tiocianato urinario y el número de cigarrillo consumidos diariamente, pues este dato no fue determinado, lo cual podría ayudar a discernir el punto de corte en la concentración de tiocianato urinario capaz de discriminar de manera más confiable a los sujetos fumadores de los no fumadores, tal y como ha sido previamente reportado.¹⁷

Conclusiones

⊕Es de suma importancia la determinación de tiocianatos urinarios y relacionarla con la exposición al humo de tabaco, ya que pudiera considerarse como un indicador del riesgo en personas expuestas, tanto fumadores activos como pasivos. Si el individuo posee un buen sistema de detoxificación, presentará niveles urinarios elevados; por otra parte, cifras bajas de tiocianatos pueden estar relacionadas con una escasa exposición al humo o presentar capacidad disminuida en los mecanismos de detoxificación.

⊕Para mejorar las tasas de abandono del hábito de fumar se necesita un tratamiento eficaz que incluya el análisis del estado tabáquico. Un aspecto a resaltar es que una proporción importante de los pacientes tienden a mentir sobre sus hábitos de consumo de cigarrillo, por lo cual es necesario contar con biomarcadores confiables. Aunque la presencia de una alta concentración de un biomarcador indica que se ha producido un tabaquismo activo, la interpretación de concentraciones más bajas de los biomarcadores es menos sencilla.

Para distinguir a los fumadores de los no fumadores, incluidos los fumadores pasivos y las personas que consumen cigarrillo sin humo u otros productos que contienen nicotina, se debe utilizar un método con un alto poder de discriminación. En este estudio se determinaron los niveles de tiocianato urinario como un biomarcador para evaluar el estatus del consumo de cigarrillo.

⊕En este estudio no fueron relacionadas la frecuencia en el hábito de fumar y el tiempo que los individuos tienen fumando, con los niveles de tiocianato en la orina. En cuanto al cuestionario aplicado a los participantes donde fueron considerados ciertos factores que pueden influir en los niveles de tiocianato en el cuerpo, tales como: lugar de residencia, hábitos alimenticios, estilo de vida, antecedentes patológicos, entre otros, se puede decir que no se encontró relación entre los factores considerados y los niveles de tiocianato en

orina. Los únicos factores relacionados con dichos niveles fueron el uso del cigarrillo y la exposición al humo del cigarrillo.

⊕ Los resultados obtenidos en esta investigación pueden ser utilizados para sensibilizar a la población con respecto al uso y abuso del cigarrillo, debido al daño que el humo de este puede causar no solo en fumadores activos, sino también en fumadores pasivos, eso sin tomar en cuenta la contaminación que se genera con el humo del cigarrillo. El gobierno también puede utilizar los resultados de este estudio para formular políticas y estrategias para reducir la exposición al humo del cigarrillo, ya que aborda algunos de los problemas de salud que afectan a la población.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes por facilitar sus instalaciones y equipos para la realización de este trabajo.

Referencias

- 1.- Haque, M.; Bradbury, H. (1.999). Simple Method for Determination of Thiocyanate in urine. *Clinical Chemistry*. 45(9): 1459-1464.
- 2.- World Health Organization (WHO). (2009). Cyanogen chloride in drinking-water. Background document for development of WHO. Guidelines for drinking-water quality. Geneva (WHO/HSE/WSH/09.01/9).
- 3.- Pérez, R. (2019). Los cianuros como veneno en la toxicología forense. *Gaceta Internacional de Ciencias Forenses*. 33: 44-80.
- 4.- Walton, H.; Reyes, J. *Análisis Químico e Instrumental Moderno*. Barcelona (España): Editorial Reverté. 2.008.
- 5.- García, M.; Cobo, I. (1.989). Marcadores Biológicos del Tabaco. *Medicina Clínica*. 93:186-188.
- 6.- González, E. (1.992). Estudio de la impregnación tabáquica en recién nacidos de madres fumadoras pasivas. [Tesis Doctoral]. Universidad de Murcia, Dpto. de Ciencias Sociosanitarias, Medicina Legal y Toxicología. Murcia (España).
- 7.- Jarvis, M.J.; Tunstall-Pedoe, H.; Feyerabend, C.; Vesey, C.; Saloojee, Y. (1984). Biochemical markers of smoke absorption and self-reported exposure to passive smoking. *Journal of Epidemiologic Commune Health*; 38(4):335-339.
- 8.- Castillo, L.; Rivas, K. (2016). Niveles de Yoduro y Tiocianato en Muestras de Orina Matinal de Personas Fumadoras utilizando Espectrofotometría Visible. Tesis de Licenciatura. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
- 9.- García, R.; González, J.; Jornet, J.M. (2010). SPSS: Pruebas no Paramétricas. Kolmogorov-Smirnov. Grupo de Innovación Educativa. Universitat de València.
- 10.- DATAtab Team (2024). DATAtab: Online Statistics Calculator. DATAtab e.U. Graz, Austria. URL <https://datatab.es>

- 11.- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I).Validación de Métodos Analíticos. Monografías. Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad; 2.001.
- 12.- Prue, D.M.; Martin, J.E.; Hume, A.S.; Davis, N.S. (1981). The reliability of thiocyanate measurement of smoking exposure. *Addiction Behaviour*. 6:99-105.
- 13.- Prignot, J. (1987). Quantification and chemical markers of tobacco exposure. *European Journal of Respiratory Diseases*. 70 (1):1-7.
- 14.- Logue, B.A.; Maserek, W.K.; Rockwood, G.A.; Keebaugh, M.W.; Baskin, S.I. The analysis of 2-amino-2-thiazoline-4-carboxylic acid in the plasma of smokers and non-smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2009; 19(3):202-8.
- 15.- Logue, B.A.; Kirschten, N.P.; Petrikovics, I.; Moser, M.A.; Rockwood, G.A.; Baskin, S.I. Determination of the cyanide metabolite 2-aminothiazoline-4-carboxylic acid in urine and plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005; 819(2):237-44.
- 16.- Vinnakota, C.V.; Peetha, N.S.; Perrizo, M.G.; Ferris, D.G.; Oda, R.P.; Rockwood, G.A., et al. Comparison of cyanide exposure markers in the biofluids of smokers and non-smokers. *Biomarkers*. 2012; 17(7):625-33.
- 17.- Siqueira, M.E.P.B. de; Vieira, E.P.; Brockelmann, C.S.R.; Martins, I. Avaliação de bioindicadores da exposição à fumaça do tabaco: carboxiemoglobina, tiocianato plasmático e tiocianato urinário. *RBCF, Rev. bras. ciênc. farm.* 1999; 35(1):65-72.