

O MONÓXIDO DE CARBONO COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO EM UM
MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA

Fernando Antônio de Lima Júnior

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA
BIOMÉDICA.

Aprovada por:

Prof. Antonio Giannella Neto, D.Sc.

Prof. Frederico Caetano Jandre de Assis Tavares, D. Sc.

Prof. Martin Schmal, Dr. Ing.

Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, D. SC

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

ABRIL DE 2005

LIMA JÚNIOR, FERNANDO ANTÔNIO DE
O Monóxido De Carbono Como Marcador
Inflamatório Em Um Modelo De Lesão
Pulmonar Aguda [Rio de Janeiro] 2005

IX, 80 p., 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc.,
Engenharia Biomédica, 2005)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Monóxido de Carbono 2. Monitorização
Pulmonar 3. Ventilação Mecânica

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me dado a oportunidade e por ter se mantido fiel em todos os momentos.

A minha família, benção de Deus: meus pais, que vivem para apoiar e amparar minhas investidas e que, mais uma vez, se propuseram a ser o suporte necessário para mais esta etapa; minha irmã, que me abrigou e me incentivou com sua luta, e a minha avó, *in memoriam*, que empregou sua vida para o conforto e felicidade da nossa família, sempre preocupada com meu futuro e com meu bem estar, estando presente em todos os momentos de minha vida, até seu ultimo dia.

AGRADECIMENTOS

A Antonio Giannella Neto pelo apoio, paciência e compreensão, ficando do meu lado em todos os momentos difíceis que passei; e, também, pela dedicada e criteriosa correção deste trabalho.

Ao. Professor Martin Schmal, que disponibilizou os equipamentos necessários para a execução deste trabalho.

Ao Engenheiro Ayr Bentes, que, no processo de teste dos equipamentos, sempre se mostrou confiante diante das incertezas e nunca desistiu de ajudar.

Aos Engenheiros Luiz Costa, e sua habitual boa disposição, e Luciano Kagami, pela presteza na ajuda durante os experimentos.

A mais completa e divertida equipe de pesquisa: a sabedoria do Alysson Roncally em fisiologia e, agora, em matemática e física; o conhecimento em programação e a prontidão do Alexandre Pino; a útil e profusa curiosidade do Frederico Jandre; aos multimídias, em medicina e culinária, Fernando Bozza e Jorge Salluh, e aos dedicados veterinários Fábio Ascolli e João Soares. A todos eles, e pela liderança de Antonio Giannella, queria agradecer por me despertarem para o conhecimento dos mais diversos assuntos, durante os longos dias de experimento, e dos quais já me sinto saudosos.

A todos do laboratório do Núcleo de Catálise da Engenharia Química, que me acolheram como um deles e tanto me auxiliaram.

Aos professores, mestres e amigos, em todos os momentos.

Aos amigos que fiz entre as pessoas de vários laboratórios e entre os funcionários, e que são os melhores resultados deste trabalho.

Às agências CNPq e PRONEX, pelo suporte financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

O MONÓXIDO DE CARBONO COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA

Fernando Antônio de Lima Júnior

Abril/2005

Orientador: Antonio Giannella Neto.

Programa: Engenharia Biomédica

A análise de moléculas gasosas provenientes de processos inflamatórios, vem ganhando destaque nas últimas décadas, em decorrência do interesse por modalidades não invasivas de monitorização da inflamação pulmonar visando à prevenção de danos decorrentes da ventilação artificial. Nesta tese, apresenta-se um protocolo de monitorização do monóxido de carbono como marcador inflamatório em um modelo suíno de lesão pulmonar aguda (LPA). O ar expirado dos animais foi analisado por cromatografia gasosa. O valor do monóxido de carbono expirado (eCO) basal foi de $5,10 \pm 2,58$ ppm. Os níveis de eCO entre os momentos anteriores e posteriores à injúria pulmonar apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,01$), assim como a comparação com o grupo Controle, sem LPA ($p < 0,02$). Uma relação significativa foi apresentada entre o eCO e os níveis de neutrófilos obtidos do lavado broncoalveolar ($r = 0,71$), mas não para a mecânica pulmonar ($r = 0,19$) e os valores gasométricos de PaO_2 ($r = 0,12$) e PaCO_2 ($r = 0,21$). Os objetivos da identificação da presença e da quantificação do eCO no modelo de LPA proposto foram atingidos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

THE CARBON MONOXIDE AS AN INFLAMMATORY MARKER ON AN ACUTE LUNG INJURY MODEL.

Fernando Antônio de Lima Júnior

April/2005

Advisor: Antonio Giannella Neto.

Department: Biomedical Engineering

The analysis of gas molecules originated from inflammatory processes is presenting a growing importance in the last decades, as result of the interest on the noninvasive monitoring of pulmonary inflammation in order to prevent injuries induced by artificial ventilation. In this thesis a monitoring protocol is presented to evaluate the carbon monoxide (CO) as an inflammatory marker of an acute lung injury (ALI) swine model. The analysis of expired CO (eCO) was performed by gas chromatography. The basal eCO was 5.10 ± 2.58 ppm. The comparisons of eCO prior and after lung injury as well as with the control group without ALI presented statistical significances ($p < 0.02$ and $p < 0.01$, respectively). A significant correlation was present between eCO and neutrophils from bronchoalveolar lavage ($r = 0.71$), but it was not present for the pulmonary mechanics ($r = 0.19$) and the gasometry of paO_2 ($r = 0.12$) and $paCO_2$ ($r = 0.21$). The objectives of identification and quantification of eCO on this ALI model have been reached.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	ix
1 - Introdução e Objetivos	1
2. – Revisão da Literatura.....	4
2.1 – Tecnologias em Análise de Gases	4
2.1.1 - Espectrometria de Massa	4
2.1.2 - Cromatografia Gasosa	6
2.1.2.1 – Detectores	11
2.1.3- Condensado Respiratório.....	12
2.2 – Gases Exalados.....	19
2.2.1- Óxido Nítrico	19
2.2.2- Monóxido de Carbono	23
2.2.3- Outros Gases e Marcadores	27
3 – Materiais e Métodos	31
3.1 – Materiais para a Coleta.....	31
3.1.1 - Sacolas para Gases.....	31
3.1.2 - Seringas de Vidro	32
3.1.3 - Adaptador para Coleta do Gás Exalado.....	32
3.2 – Montagem Inicial	35
3.4 – Medições	37
3.4.1 - Fluxo	37
3.4.2 – Pressão de Vias Aéreas e Esofágica.....	38
3.4.3 – Monitorização Complementar.....	38

3.5 – Aquisição dos Sinais e Processamento.....	39
3.6 – Análise dos Níveis Celulares do LBA.....	40
3.7 - Aquisição das Amostras.....	40
3.8 – Materiais para Análise.....	43
3.8.1 – Cromatógrafo I.....	43
3.8.1.1 - Validação dos Parâmetros	44
3.8.2 - Cromatógrafo II	46
3.8.1.2 - Validação dos Parâmetros	46
3.9 – Análise das Amostras	48
3.9.1. - Correção dos Níveis de eCO.....	48
3.10 - Análise das Informações	49
4 – Resultados.....	51
5 - Discussão.....	66
6 – Conclusão	71
7 - Anexo I.....	72
8 – Referências Bibliográficas.....	73

Lista de Abreviaturas

Símbolo	Significado	Página
CO	Monóxido de carbono	02
CO ₂	Dióxido de carbono	01
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica	02
eCO	Monóxido de carbono exalado	02
ELF	Fluido de forração epitelial	13
FID	Detector de ionização por chama	11
F _I O ₂	Fração inspirada de oxigênio	26
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio	13
LBA	Lavado broncoalveolar	03
LPA	Lesão Pulmonar Aguda	v.
NO	Óxido nítrico	02
NOS	Óxido Nítrico Sintase	19
PaCO ₂	Pressão arterial de CO ₂	37
PaO ₂	Pressão arterial de O ₂	37
PEEP	Pressão positiva ao fim da expiração	33
PPB	Partes por bilhão	01
PPM	Partes por milhão	01
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	02
TCD	Detector por condutividade térmica	11

1 - Introdução e Objetivos

A detecção de compostos orgânicos voláteis presentes na respiração tem uma longa história, pois desde a Antigüidade se sabe que o odor da respiração humana pode conter importantes indícios para o diagnóstico. Isto se deve ao fato de apenas uma delgada barreira, a membrana alvéolo-capilar, separar o ar dos pulmões do sangue. Eram conhecidos os odores de acetona no paciente diabético, o cheiro de amônia que acompanha a falência renal e o odor de decomposição de um abscesso pulmonar (PHILLIPS, 1992).

Entretanto, sem uma análise química objetiva, estes testes não tem eficiência sob o entendimento quantitativo da patologia investigada. Por esta razão, apenas gases de fácil detecção foram encontrados na expiração humana, como o Dióxido de Carbono (CO₂), que corresponde a aproximadamente cinco por cento do ar exalado. Como a maioria dos compostos na respiração se apresentam em baixas concentrações, de partes por milhão (PPM) até partes por bilhão (PPB), a utilização desta prática diagnóstica ficou comprometida e, sua evolução dependeu estritamente do avanço tecnológico, do melhor entendimento das funções orgânicas e da agregação destas duas áreas.

Durante a segunda metade da década de 60 aconteceu, na Rússia, a primeira análise de compostos orgânicos presentes no ar exalado em humanos (PAREDI *et al.*, 2000). As pesquisas se intensificaram a partir de 1971, com a constatação de que aproximadamente 250 compostos voláteis estariam presentes na respiração normal dos indivíduos (PAULING *et al.*, 1971). Estes compostos orgânicos voláteis, como o eteno e o pentano, são procedentes do sangue e, por difusão passiva através da membrana alveolar, podem ser eliminados na respiração (PHILLIPS *et al.*, 1997). Vários estudos subsequentes confirmaram a presença destes compostos voláteis na respiração humana (PHILLIPS, 1992).

Devido a uma série de problemas tecnológicos e práticos, a pesquisa nesta área continuou progredindo lentamente. Por isso, somente em 1991 houve a primeira identificação de um gás endógeno, o óxido nítrico, presente no ar expirado de animais e humanos (DUCKWORTH *et al.*, 1999).

A descoberta de moléculas gasosas provenientes de resíduos inflamatórios como o óxido nítrico (NO), o monóxido de carbono (CO), alcanos e aminas, e a presença destas moléculas em diversos processos biológicos, despertou grande interesse da comunidade científica. Estas moléculas passaram a ser utilizadas para monitorar a inflamação e os estresses oxidativos das vias aéreas, sobretudo em patologias como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a asma.

Em 1993, a asma foi a primeira patologia a ser associada a níveis elevados de NO exalado, e desde então vários estudos foram efetuados tentando descobrir o possível papel do NO e do CO na fisiopatologia desta e de outras patologias. Hoje em dia, o NO expirado é o marcador expiratório mais extensivamente estudado (KHARITONOV *et al.*, 2001a).

Os equipamentos comumente utilizados para se medir a concentração dos gases exalados são os analisadores que se valem dos princípios da cromatografia gasosa, da espectrometria de massa, e da associação entre eles, entre outros. Estes equipamentos são capazes de detectar moléculas gasosas em muito baixas concentrações. As amostras de gás expirado podem ser inseridas nestes equipamentos através do método *on-line*, isto é, o paciente expira diretamente no equipamento, através de um bocal, ou pode ser utilizada a amostragem *off-line*, onde se aproveitam amostras do gás exalado acondicionadas em recipientes específicos (SILKOFF *et al.*, 1999). A variabilidade das técnicas de coleta das amostras para cada gás e, também, a diversidade dos métodos de análise acarreta uma falta de consenso entre as técnicas empregadas. A lacuna deixada por essas discordâncias motivou a Sociedade Torácica Americana a publicar uma cartilha de recomendações sobre procedimentos para a medida dos gases exalados em diferentes técnicas de investigação (SILKOFF *et al.*, 1999).

Um princípio fundamental da análise dos gases exalados é o fato de se tratar de uma técnica não invasiva. Esta monitorização não invasiva para estudo de marcadores inflamatórios presentes na respiração é uma ótima alternativa de reduzir os riscos ao paciente e de diminuir a perturbação do sistema visando à prevenção de danos às vias aéreas do paciente.

Este trabalho tem como objetivo a identificação da presença e a quantificação do CO no gás expirado (eCO) na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), induzida por ácido oléico, em suínos sob ventilação mecânica, e sua relação com a

mecânica pulmonar e com a presença de marcadores de inflamação no lavado broncoalveolar (LBA).

Caso se confirme a confiabilidade da técnica na identificação dos gases exalados, esta poderá ser empregada para a monitorização de doenças respiratórias, permitindo uma intervenção precoce e a minimização das complicações pulmonares.

2. – Revisão da Literatura

2.1 – Tecnologias em Análise de Gases.

2.1.1 - Espectrometria de Massa

Um espectrômetro de massa é um instrumento que mede a massa de moléculas individuais ionizadas ou que mede a concentração de uma certa substância presente numa mistura. A espectrometria de massa é uma técnica analítica usada para identificar compostos desconhecidos e quantificar materiais conhecidos. A detecção de compostos pode ser realizada em concentrações muito baixas (uma parte em cada 10^{12}) em misturas quimicamente complexas (DUARTE, 2001).

A técnica de espectrometria de massa teve início no começo do século passado com o tubo de vácuo de J.J. Thomson, onde se demonstrou a existência de elétrons. Thomson observou que a nova técnica poderia ser usada para analisar produtos químicos. Apesar desta observação, somente após trinta anos esta técnica foi utilizada para descobrir isótopos e medir suas massas. Hoje em dia, o espectrômetro é utilizado para auxiliar na identificação da composição de um gás ou de uma mistura gasosa, podendo-se também medir a quantidade de cada componente da mistura (ANÔNIMO, 1967).

A amostra de gás é inserida no espectrômetro por meio de injeções de pequeno volume através de um septo, de silicone ou Teflon®, onde um gás puro é continuamente carregado. Para que não haja contaminação, o espectrômetro deve operar em um sistema de vácuo. Uma vez dentro do circuito, as moléculas da amostra são bombardeadas por um feixe de elétrons.

A energia dos elétrons de bombardeamento é geralmente muito maior do que a das ligações que mantêm a molécula unida. Então, quando um elétron de alta energia choca-se com uma molécula gasosa, além da ionização, pode haver também quebras de ligações, formando fragmentos. Isto faz com que passem a existir outros íons, juntamente com os

íons moleculares intactos. Embora sejam formados íons positivos e negativos, apenas uma polaridade é analisada a cada vez. As moléculas que não foram ionizadas, assim como fragmentos neutros, são bombeados para fora do sistema. Neste método, os íons positivos são mais frequentemente analisados, pois poucos íons negativos são formados por esta técnica em comparação com os íons positivos (SPELLER *et al.*, 2001).

Após a ionização, os íons positivos são coletados pelo detector para dentro de um analisador. O analisador usa filtros para classificar os íons de acordo com as suas massas, ou razões massa / carga selecionadas. Somente estes íons serão coletados pelo detector (VEGA-BUSTILHOS *et al.*, 2001). Os analisadores mais usados são os de setor magnético, de tempo de voo e os quadrupolares (Figura 1).

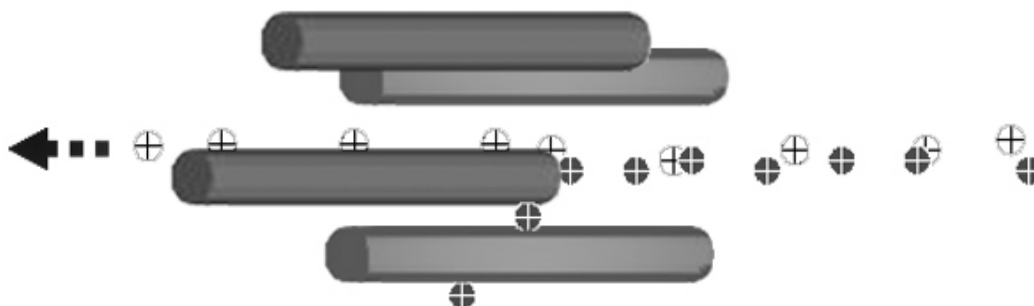


Figura 1 – Filtragem de íons através de um analisador quadrupolo. Adaptado de SPELLER *et al.* (2001).

Ao atravessarem o filtro do analisador, os íons com a razão massa / carga selecionada passam através do analisador para serem coletados pelo detector, enquanto íons valores de massa / carga diferente colidem com as barras ou escapam por entre elas.

Depois de passarem pelo analisador, os íons selecionados alcançam o detector, que consiste em um multiplicador de elétrons, capaz de multiplicar em milhões de vezes a corrente produzida por cada íon que o atinge. Assim, a corrente iônica é transformada em corrente eletrônica, podendo apresentar um ganho superior a 10^6 , possibilitando a sua detecção. Então, o sinal amplificado é interpretado por um circuito eletrônico na forma de um espectro de massa.

Um dos problemas deste tipo de equipamento é em relação ao septo, isto é, o local onde são injetadas as amostras no espectrômetro, que, por ser feito de silicone ou teflon, pode apresentar vazamentos com o tempo de uso devido às repetidas injeções. A solução é a troca periódica do mesmo e sangria, mas isto pode ocasionar instabilidades na linha de base e o aparecimento de picos fantasmas.

2.1.2 - Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa consiste em uma técnica analítica para a separação de compostos voláteis através da filtragem de um fluxo de gás por uma fase estacionária (sólida ou líquida) (Figura 2-a). Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a cromatografia é um método físico de separação distribuído em duas fases, uma fica estacionária, enquanto a outra se move em uma direção definida. A separação ocorrida na fase estacionária permite que os compostos sejam separados no espaço (MCNAUGHT *et al.*, 1997).

A cromatografia gasosa é uma técnica com ótimo poder de resolução, tornando possível muitas vezes a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Outra vantagem da cromatografia gasosa é sua sensibilidade. Dependendo do tipo de substância a ser analisada e do detector empregado, como os detectores de captura de elétrons, pode-se conseguir medir em partes por bilhão, ou mesmo em Picogramas (10^{-12} g) (MCNAIR *et al.*, 1969).

A cromatografia gasosa foi empregada pela primeira vez por Ramsey, em 1905, para separar uma mistura de gases e vapores. Entretanto, foi em 1903 que Mikhail Tswett, um botânico russo, deu origem ao termo cromatografia ao obter discretas faixas de cores de pigmentos vegetais em uma coluna cromatográfica de carbonato de cálcio. O nome da técnica, cromatografia, é composto pelos termos gregos *chroma*, que significa “cor”, e *graphein*, que significa “escrever”. Apesar do termo “escrever com cores” não se aplicar aos métodos atuais de cromatografia, os mesmos princípios de separação ainda são utilizados.

Em 1952, Archer Martin e Richard Synge receberam o prêmio Nobel de química pelo estudo da cromatografia de separação e pela introdução de um novo método, a cromatografia gás-liquido. Após a divulgação dos princípios de Martin e Synge, houve um rápido crescimento deste método de separação, identificação e determinação de compostos voláteis, devido a sua sensibilidade, acurácia e simplicidade técnica (ANÔNIMO, 1967).

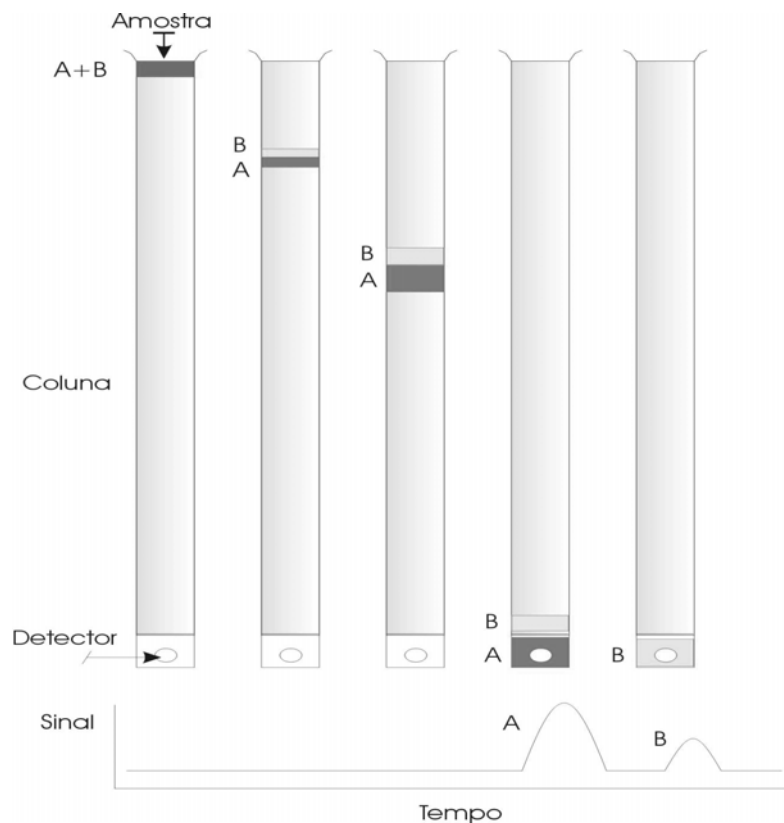


Figura 2 – a) Diagrama mostrando a separação da mistura dos componentes A e B por uma coluna cromatográfica. b) Sinal de saída do detector (cromatograma) nos estágios da mistura. Adaptado de ROVARIL *et al.* (2000).

As partes básicas de um cromatógrafo são o gás carreador, o controle de fluxo e pressão, a porta de injeção da amostra, a coluna e o detector.

A cromatografia requer uma fonte de gás de arraste de qualidade e pressão suficientes para executar as separações desejadas. A escolha do melhor gás de arraste é importante porque afeta tanto o processo de separação da coluna quanto a performance do detector. Entretanto, a escolha do gás independe da amostra a ser separada.

Os gases carregadores (fase móvel) devem ser quimicamente inertes, secos e de grande pureza (> 99,98 %), livres de oxigênio e de outros contaminantes em sua composição. As impurezas de um gás carreador, como vapor d'água e ar, podem causar interações com a amostra, deterioração da coluna e também podem afetar a performance do detector. Outro parâmetro importante é a compatibilidade deste gás com o detector, pois alguns detectores trabalham melhor quando se usam determinados gases (MCNAIR *et al.*, 1969) e (SCHILLING *et al.*, 1994). Os gases mais usados para a função de arraste são o hélio (He), o argônio (Ar), o nitrogênio (N₂) e o hidrogênio (H₂).

Se a fase estacionária é um líquido temos a cromatografia gás-líquido ou cromatografia de partição, se a fase estacionária é um sólido temos a cromatografia gás-sólido ou cromatografia de adsorção. Em qualquer dos casos a coluna pode ser de empacotamento ou capilar aberto de sílica fundida (Figura 3). A coluna pode ser empacotada com partículas que agem como retardador da fase estacionária ou com uma espécie de coador, feito de uma fina camada de material orgânico.

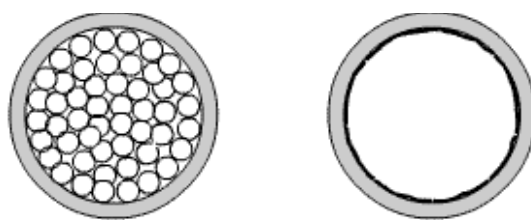


Figura 3 - Dois tipos de coluna usadas em cromatografia. O diagrama da esquerda mostra uma coluna de empacotamento. O diagrama da direita mostra uma coluna de capilar aberto.

De acordo com ROVARIL *et al.* (2000), a técnica mais usada em Cromatografia Gasosa é a eluição, isto é, uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente nesta corrente de gás, ela é arrastada através da coluna. Durante a análise, a temperatura da coluna pode permanecer constante ou sofrer variações. A programação de temperatura é significativamente importante em cromatografia gasosa; pois com a variação da temperatura podem-se separar as diversas substâncias da amostra que apresentem grande diferença em seus pontos de ebulição.

A fase móvel, sendo gasosa, atinge um rápido equilíbrio com a fase estacionária, sendo por isso um sistema altamente eficiente. A vazão do gás de arraste deve ser constante durante a análise para que haja reprodutibilidade nos tempos de retenção; a análise quantitativa também é afetada por variação de vazão, devido à mudança nas áreas dos picos (ROVARIL *et al.*, 2000).

As colunas cromatográficas são os dispositivos fundamentais de um cromatógrafo, que permitem a separação dos constituintes da amostra. A coluna cromatográfica é um tubo longo, contendo a fase estacionária. Para obter a separação dos compostos é necessário que a coluna seja seletiva, ou seja, que exista uma grande diferença entre os coeficientes de partição (ou adsorção) das substâncias de interesse (EICEMAN *et al.*, 2002).

As substâncias presentes na amostra passam através da coluna, onde são separadas, e chegam ao detector, acoplado no fim de uma coluna. A função do detector é medir a quantidade dos componentes que saem da coluna. Os detectores transformam em sinal elétrico a variação da composição do gás de arraste na saída da coluna, formando um cromatograma. Geralmente, um cromatograma é um diagrama de uma função da concentração do soluto contra o tempo (Figura 2-b).

2.1.2.1 – Detectores

O detector é o componente do cromatógrafo que indica e quantifica os componentes presentes no gás carreador, após serem separados pela coluna. Segundo EICEMAN (2000), apesar da diversidade de detectores existentes, não existe um detector ideal para todos os compostos, embora os de Ionização por Chama (FID) e Condutividade Térmica (TCD) gerem um sinal para qualquer substância eluída, podendo ser classificados como detectores universais. Por causa desta característica, estes são os detectores mais usados em cromatografia gasosa.

O TCD consiste em um filamento de tungstênio aquecido pela passagem de uma corrente elétrica constante. O gás carreador, ao fluir continuamente por este filamento, gera uma dissipação de calor numa taxa constante. Quando o gás da amostra passa pelo filamento aquecido, a taxa de dissipação de calor diminui, aumentando a resistência do filamento à passagem da corrente. Essa mudança na resistência é medida pela diferença de voltagem e a alteração do sinal gerado forma um pico cromatográfico. Este pico varia de acordo com as mudanças na propriedade de dissipação de calor em função da massa molecular do gás da amostra (MCNAIR *et al.*, 1969) e (EICEMAN, 2000).

No detector do tipo FID, uma chama é mantida através da combustão de uma mistura de hidrogênio e ar. Ao passar pelo detector, a amostra sofre combustão sendo ionizada. Um potencial elétrico constante é aplicado em eletrodos situados acima da chama, e, conforme compostos diferentes sofrem combustão, a condutividade da chama é alterada. O FID detecta a corrente elétrica gerada e a envia para ampliação e geração do cromatograma, baseado no fato de que a concentração de cada gás é proporcional ao número de íons formados. O FID é, em geral, o melhor detector para se analisar compostos orgânicos, devido a sua simplicidade e segurança (POLITZER, 2004) e (OLIVEIRA *et al.*, 1998)

Segundo EICEMAN (2000), existem ainda vários outros detectores, com respostas mais específicas e seletivas a determinados compostos, como o detector por captura de

elétrons (ECD), o detector de chama fotométrica (FPD) e o detector de emissão atômica (AED).

VON MUHLEN *et al.* (2004) ponderam que, além de incentivar o incremento de novos detectores para sistemas usuais, o avanço em Cromatografia e a tendência à miniaturização estão levando ao desenvolvimento de detectores em dimensões cada vez menores, sem perder o objetivo da maior versatilidade possível em suas utilizações de detecção de compostos variados.

2.1.3- Condensado Respiratório

O estresse oxidativo é definido como um aumento à exposição aos agentes oxidantes ou a diminuição da capacidade antioxidante do organismo (HANAZAWA *et al.*, 2000). Esta alteração é resultado das doenças inflamatórias de vias aéreas como a DPOC e a asma (DE BENEDETTO *et al.*, 2000).

As inflamações de vias aéreas desempenham um papel central no desenvolvimento e progresso de várias patologias pulmonares através da ativação de células inflamatórias como os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos.

Para se avaliar o grau de inflamação das vias aéreas inferiores, métodos tradicionais, invasivos, de amostragem de secreções têm sido usados, como a Expectoração Induzida ou Escarro Induzido, a broncoscopia e o LBA (HALE *et al.*, 2003).

A “Expectoração Induzida” consiste na nebulização de elevadas concentrações salinas (3-5%) pelo paciente. Isto estimula a secreção pulmonar e, à medida que o paciente tosse, a expectoração é coletada e utilizada para análise, como por exemplo, a análise de celularidade e análise bacteriológica.

O LBA é um procedimento para coletar amostras das vias aéreas menores. Um tubo é inserido no interior de uma via aérea pequena, onde uma substância salina (soro fisiológico) é instilada através do instrumento e, logo após, succionada juntamente com o

fluido respiratório, resultando na coleta de células e algumas bactérias que ficam misturados na solução (ANÔNIMO, 1987).

Entre os métodos citados, o LBA tem sido o preferido para se amostrar o fluido de forração epitelial (ELF) do trato respiratório inferior (MUTLU *et al.*, 2001).

Ambos procedimentos descritos são muito invasivos e causam inflamação dos pulmões. Além disto, estes métodos não se mostram os ideais para se coletar múltiplas amostras, pois podem alterar o conteúdo do ELF (MONTUSCHI *et al.*, 2002).

O ELF contém cerca de 200 substâncias voláteis como o NO e o CO (EFFROS *et al.*, 2002), mas atualmente, os estudos se voltam para a detecção das moléculas não voláteis presentes no expirado respiratório, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), proteínas, lipídios e oxidantes; sendo que estas moléculas representam os marcadores biológicos de vários processos patológicos dos pulmões.

Segundo MUTLU *et al.* (2001), o ar exalado é saturado de vapor d'água e substâncias não voláteis do fluido do trato respiratório inferior são transportadas no ar expirado, sob a forma de partículas aerossóis.

Durante a respiração normal, os níveis de partículas aerossóis provenientes do ELF são de 0,1 a 4 partículas/cm³, sendo que o diâmetro médio dessas partículas é menor que 0,3 µm. O número de partículas formadas no trato respiratório depende da velocidade do ar e da tensão de superfície do ELF (FAIRCHILD *et al.*, 1987).

O fluido resultante da condensação destas partículas, conseguida através do resfriamento do ar expirado, é conhecido como condensado respiratório expirado (EBC) ou apenas condensado respiratório (BC).

A análise do condensado respiratório tem recebido recente interesse devido à busca de um método fácil e reprodutivo de se avaliar e monitorar as doenças pulmonares e de vias aéreas, fornecendo informações sobre o estresse oxidativo pulmonar (GESSNER *et al.*, 2001).

O condensado respiratório possui vantagens sobre o LBA, pois é um método não invasivo, é de menor custo em termos de equipamento, e, geralmente, demanda amostras mais concentradas do fluido das vias aéreas (CARPENTER *et al.*, 1998).

A coleta do material envolve o rápido resfriamento do ar expirado, gerando condensação do vapor d'água bem como sua precipitação e a incorporação das partículas aerossóis do ELF nas superfícies frias. Esta precipitação possibilita uma amostra do ar expirado na forma líquida (GESSNER *et al.*, 2001).

A completa condensação do ar expirado vai depender do tamanho e da forma da superfície resfriada, da velocidade do ar que passa por essa superfície e do gradiente de temperatura (BECHER *et al.*, 1997).

A coleta da condensação respiratória é simples e fácil de se executar. Na maioria dos estudos utilizam-se equipamentos de fabricação própria que geralmente consistem de um bocal conectado a uma válvula unidirecional que evita a contaminação das fases inspiratórias e expiratórias. Então, o ar expirado vai para um sistema de coleta (tubo expiratório), que fica mergulhado em uma solução de resfriamento, podendo ir desde 0 °C (gelo derretido) até - 20 °C (circuitos refrigerantes). Após passar por este tubo, o ar resfriado é condensado e coletado em um recipiente, que é mantido frio (Figura 4). Manter o condensado frio é importante para a preservação de certos mediadores lipídicos e proteínas presentes no condensado.

Alternativamente, há um sistema produzido comercialmente conhecido por EcoScreen (Jaeger, Alemanha), mas que é muito caro e não há evidências da vantagem deste equipamento sobre os de fabricação própria.

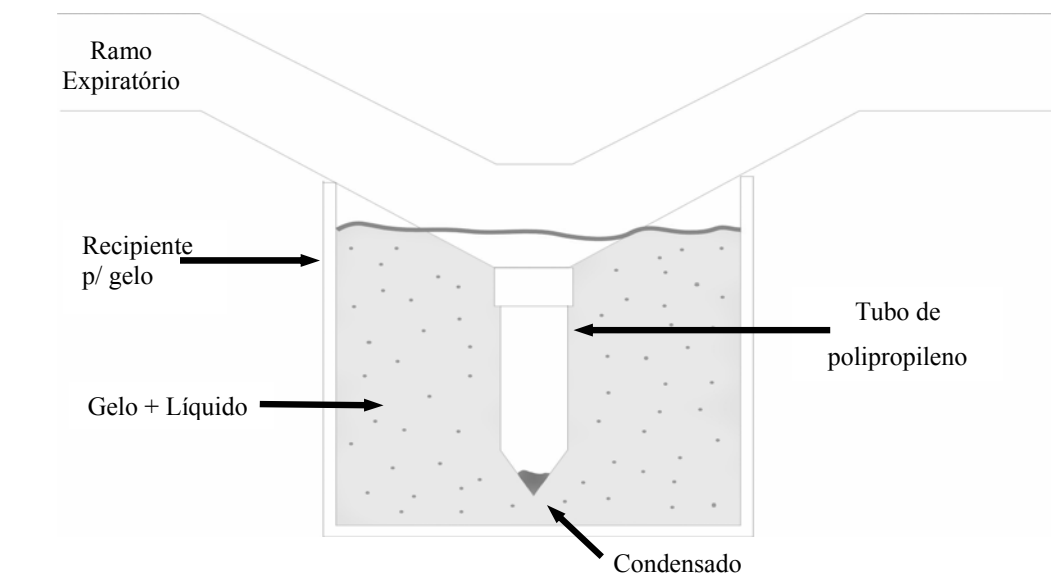


Figura 4 - Representação de um coletor de condensado. Adaptado de MUTLU *et al.* (2001).

Além da variedade de protótipos criados para se coletar o condensado respiratório, ainda existe uma controvérsia relacionada com as temperaturas de coleta e armazenagem do condensado.

Os estudos em que foram utilizados os condensadores comerciais EcoScreen, mantiveram o padrão descrito pelo fabricante, que consiste no resfriamento do sistema e posterior coleta do condensado em forma de gelo, a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com a estocagem imediata do material a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neste sistema, 10 minutos de respiração podem produzir 1 ml de condensado.

Há estudos em que se utiliza o equipamento comercial RHES (Jaeger, Alemanha), que produz ar frio de -15 a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, com um fluxo de até 80 L/m. Nestes estudos, um tubo duplo de vidro é adaptado ao sistema expiratório e no final deste tubo é coletado o

condensado. Após a coleta, a amostra é estocada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nestes estudos foram colhidos, após 10 minutos de respiração normal, de 1 a 2 ml de condensado.

CARPENTER *et al.* (1998) adaptaram um tubo de Teflon de 100 cm de comprimento no ramo expiratório do circuito do ventilador. O tubo foi submerso em um banho de gelo (álcool e gelo). Durante um período de 30 a 60 minutos foram coletados de 1 a 3 ml de condensado.

CORRADI *et al.* (2001) utilizaram um condensador de vidro, que consiste num tubo de vidro duplo, com sua câmara interna preenchida com gelo. O ar é expirado pela câmara externa e o condensado é formado na parede de vidro que separa as duas câmaras. Durante 15 minutos foram colhidos 0,5 ml de condensado, que foi imediatamente congelado e armazenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, em nitrogênio líquido. Segundo este estudo, as amostras ficaram estocadas durante 15 dias sem perda de atividade enzimática.

ZAPPACOSTA *et al.* (2001) desenvolveram um sistema em que um tubo de PVC era conectado no bocal com uma válvula unidirecional. Na outra extremidade, o tubo se conectava numa serpentina de vidro, resfriada por um sistema de água gelada corrente. O condensado foi armazenado à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, em um tubo *micropestle* (Eppendorf, Alemanha).

GUATURA *et al.* (2000) utilizaram um tubo plástico imerso num recipiente contendo uma mistura de gelo seco e etanol. Deste modo, 2 ml de condensado foram colhidos após 30 minutos de respiração normal. As amostras foram guardadas em gelo seco, dentro de um congelador, à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Segundo HALE *et al.* (2003), embora temperaturas mais baixas permitam a formação de mais condensado, a desvantagem de se congelar a amostra é que ela terá de ser derretida para a análise, e isto pode causar a desnaturação de certas proteínas. Sendo assim, a amostra do condensado deve ser coletada e mantida em torno dos $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, sem que a amostra apresente um padrão de congelamento superficial (talhar), o que também poderia trazer dano ao condensado.

MUTLU *et al.* (2001) alertam para o fato de que, para algumas substâncias instáveis, como os leucotrienos, deve-se utilizar o gelo seco ou o nitrogênio líquido com o objetivo de manter a temperatura entre -5 e $+5$ °C.

Dois estudos relataram a preocupação com o ar expirado antes mesmo de sua condensação. HALE *et al.* (2003) aqueceram o tubo expiratório desde a boca até a câmara de resfriamento para prevenir que ocorresse a condensação antes do ar atingir a câmara. Para isto foi utilizada uma fita aquecedora comercial (BriskHeat Corp., Inglaterra), enrolada no tubo expiratório. Este equipamento possui como vantagens o controle da temperatura e a flexibilidade do material.

CARPENTER *et al.* (1998) relataram que, antes de se iniciar os procedimentos de coleta, o umidificador do ventilador foi retirado. Este procedimento teve como objetivo evitar uma dissolução acentuada das amostras pelo excesso de vapor d'água produzido por este equipamento.

GESSNER *et al.* (2001) descreveram outros fatores que influenciam a formação e a coleta do condensado respiratório. Foi demonstrada que a formação do condensado sofre significativa correlação com o fluxo respiratório do ventilador. No entanto, nenhuma relação foi encontrada entre a formação e coleta do condensado com o peso dos pacientes, a idade, e os testes de função pulmonar.

Vários marcadores de estresse oxidativo foram encontrados no condensado respiratório de indivíduos normais e se mostraram aumentados em pacientes com diferentes patologias respiratórias (Tabela 1).

Além de ser um campo de pesquisa em rápido crescimento, a análise do condensado respiratório é simples e não invasiva, sendo que o fluido coletado representa o fluido de forração do epitélio pulmonar em sua forma aerossol. Outras vantagens são a possibilidade de coleta domiciliar e a análise de compostos não voláteis associados com as patologias pulmonares. Entretanto, as limitações vão além da não padronização de coletas e análises, pois o condensado respiratório não é um método que nos determina um local anatômico específico para a inflamação. Também não há evidências da origem do aerossol (brônquios

ou via aérea terminal). Outra limitação ao método é a possível evaporação das amostras, levando a um erro de concentração, bem como a sua diluição no vapor d'água gerado pelos umidificadores. Mesmo assim, vários estudos, como os de CORRADI *et al.* (1999) e MONTUSCHI *et al.* (2002), afirmam que este método é útil no diagnóstico e acompanhamento de inflamações pulmonares e que mais pesquisas são necessárias para a padronização e a definição da utilidade clínica deste método.

Tabela 1 - Marcadores respiratórios encontrados no condensado em diversas patologias.

Condição	Composto	Estudos
Fumantes	H ₂ O ₂ , 8-Isoprostano	ZAPPACOSTA <i>et al.</i> (2001); BALINT <i>et al.</i> (2001)
DPOC	H ₂ O ₂ , citosinas, 8-Isoprostano	CORRADI <i>et al.</i> (2001); MUTLU <i>et al.</i> (2001)
Asma	H ₂ O ₂ , 8-Isoprostano, leucotrienos, pH	MONTUSCHI <i>et al.</i> (1999); KOSTIKAS <i>et al.</i> (2002)
Bronquite Crônica	Leucotrienos	MUTLU <i>et al.</i> (2001)
Bronquiectasia	H ₂ O ₂	KOSTIKAS <i>et al.</i> (2002)
Fibrose Cística	H ₂ O ₂ , 8-Isoprostano, nitritos, Interleucina-8	CORRADI <i>et al.</i> (2001); HO <i>et al.</i> (1998)
SDRA	H ₂ O ₂ , 8-Isoprostano, Prostaglandina E ₂	CARPENTER <i>et al.</i> (1998); ANTCZAK <i>et al.</i> (2002); MONTUSCHI <i>et al.</i> (2002)

H₂O₂ é o peróxido de hidrogênio; DPOC é a doença pulmonar obstrutiva crônica; SDRA é a síndrome da angústia respiratória aguda.

2.2 – Gases Exalados

2.2.1- Óxido Nítrico

O óxido nítrico, que já foi considerado um poluente atmosférico, é hoje conhecido como uma das moléculas de maior relevância nos mamíferos. O NO é um radical livre gasoso, produto final do metabolismo de nitratos orgânicos.

O NO endógeno atua como molécula sinalizadora dos sistemas neurológico, cardiovascular e imunológico, desempenhando um importante papel na fisiopatologia respiratória (SANCHEZ *et al.*, 2001).

O óxido nítrico é produzido no sistema biológico por um grupo de enzimas chamadas óxido nítrico sintase (NOS). Essas enzimas catalisam a arginina e o oxigênio molecular em citrulina e óxido nítrico. Postulou-se, então, ser a L-arginina a fonte de NO (RUTGERS *et al.*, 1999).

Todas as três subclasses de NOS conhecidas foram detectadas em células do sistema respiratório humano, desde as células do epitélio vascular pulmonar e epitélio das vias aéreas até os macrófagos alveolares (ASANO *et al.*, 1994).

GUSTAFSSON *et al.* (1998) mediram a presença do NO do ar expirado de coelhos, porcos e humanos. Neste estudo concluiu-se que o NO tinha um papel regulador da vascularização pulmonar, bem como se sugeriu um caráter de defesa deste gás na patofisiologia pulmonar.

Dois anos depois, ALVING *et al.* (1993) descobriram que a maior parte do NO expirado é proveniente da região nasal, com pequena contribuição das vias aéreas inferiores. Neste mesmo estudo foi caracterizada a importância de se monitorar o NO como regulador de processos inflamatórios. Este foi o primeiro estudo relacionando o aumento da concentração de NO em pacientes asmáticos. No mesmo ano, BORLAND *et al.* (1993)

sugeriram que o NO é derivado da mesma região pulmonar que o monóxido de carbono (CO). Este estudo reproduziu com sucesso as técnicas de medição do NO do ar expirado.

Buscando confirmar a presença de NO no ar expirado de humanos, LEONE *et al.* (1994) demonstraram que, tanto a análise através do espectrômetro de massa quanto da cromatografia gasosa, e mesmo a associação destes ofereciam evidências da presença deste gás. O valor médio encontrado foi de 13 ppb em sete homens voluntários.

Buscando confirmar os níveis elevados do NO em pacientes asmáticos, MASSARO *et al.* (1995) determinaram uma concentração mais baixa de NO para indivíduos normais – 6,2 ppb – em uma amostra de 90 homens saudáveis. A concentração de NO nos 43 asmáticos estáveis foi significativamente maior – 13,9 ppb. Concluíram que as concentrações de NO no ar exalado se mostraram úteis para registrar a severidade da doença e a eficácia do tratamento nas primeiras 48 horas.

Como havia sido utilizada amostra de ar misturado, isto é, das vias aéreas superiores e inferiores, MASSARO *et al.* (1996) coordenaram, um ano depois, um estudo em que se utilizou um tubo endotraqueal para medir o NO da região da carina. Neste estudo, indicouse que a diferença de concentração do NO, no ar misturado, entre asmáticos e indivíduos saudáveis era reflexo da diferença de concentração do NO presente nas vias aérea inferiores. Os achados da broncoscopia de vias aéreas inferiores confirmaram a concentração de NO em sujeitos saudáveis na faixa de 7,0 ppb (MASSARO *et al.*, 1996).

KHARITONOV *et al.* (1996) também evidenciaram que os níveis elevados do NO expirado de pacientes asmáticos eram predominantes das vias aéreas inferiores.

BYRNES *et al.* (1997) conduziram uma pesquisa na qual encontraram significantes dependências entre os níveis de NO exalado e as condições de monitoração. Apesar disto, eles foram capazes de demonstrar que, oposto aos achados de BORLAND *et al.* (1993), o NO era produzido nas vias aéreas, e não no nível alveolar, ao contrário do dióxido de carbono.

Tentando encontrar um valor mais preciso da concentração de NO exalado, SILKOFF *et al.* (1999) conduziram um estudo em que monitoraram 55 pessoas não fumantes. Mesmo com uma nova metodologia, em que o paciente inspirava até a capacidade pulmonar total e expirava, pela boca, através de um tubo de teflon com resistência conhecida, mantendo o fluxo expiratório constante, foram encontradas variações entre 10,2 ppb até 64,6 ppb nos indivíduos analisados. Neste estudo, os pesquisadores concluíram que os níveis de NO expirados não teriam relação significativa com a idade, o sexo e o hábito de fumar. Quanto a este último fator, estudos posteriores de GOMEZ *et al.* (1998) provariam o contrário. Este trabalho apresentou valores elevados para níveis de NO basal, isto é, em sujeitos saudáveis, não fumantes. O baixo fluxo expiratório – 2 L/min – sem resistência foi o ponto determinante na contaminação do ar expirado pelo ar da cavidade nasal, como haviam evidenciado KHARITONOV *et al.* (1996), num estudo anterior.

Em sua pesquisa, KHARITONOV *et al.* (1996) demonstraram sua preocupação com os diferentes métodos de coleta do NO expirado, que poderiam estar sendo contaminados com ar proveniente das vias aéreas superiores. Neste estudo, foi usado um carreador de argônio na cavidade nasal para determinar o grau de contaminação das amostras. Durante a expiração bucal, sem resistência ou sem pressão associada, houve a contaminação do ar expirado com argônio. Esta contaminação foi atribuída à abertura do palato mole no início da expiração. Na técnica de retardo expiratório, em que se expira através de uma resistência, a análise gasosa não demonstrou contaminação, provando que a moderada resistência promoveu o fechamento do palato mole e, assim, isolando o ar da cavidade nasal. A melhor manobra, livre de contaminação nasal para aquisição de NO expirado, foi confirmada como sendo uma expiração lenta, da capacidade vital total até o volume residual, através de um tubo de pequeno diâmetro. Em concordância com este achado, KIMBERLY *et al.* (1996) provaram não haver diferença significativa de concentrações de NO entre a técnica do isolamento da cavidade nasal através de um balão de oclusão inflado e a técnica de retardo expiratório descrita por KHARITONOV *et al.* (1996). Os níveis de NO encontrados também foram similares a outros estudos para indivíduos saudáveis – 7,0 ppb (KHARITONOV *et al.* (1996) apud JARVIS *et al.* (1986)).

Outro aspecto importante na pesquisa de Kharitonov e colaboradores (KHARITONOV *et al.*, 1996) foi a validação do método de armazenamento do NO expirado em reservatórios de polietileno, sem que houvesse interferência nos resultados encontrados. De fato, SCHILLING *et al.* (1994) haviam confirmado não haver diferenças significativas na concentração de NO armazenado em sacolas de polietileno por um período superior a 12 horas.

GOMEZ *et al.* (1998) mediram as variações de NO ambiente e as compararam com o NO expirado em 20 pessoas saudáveis. A técnica empregou um tubo plástico, com diâmetro interno de 2 mm, que correspondia a uma resistência de $2,5 \text{ cmH}_2\text{O.L}^{-1}.\text{s}$. Os níveis de NO normais foram determinados em 18 ppb. O estudo concluiu que o NO ambiente está mais elevado nas primeiras horas da manhã e nos períodos de inverno. Apesar de concluir ter havido pouca influência ambiental do NO na variação dos níveis de NO no ar expirado, Gómez e colaboradores aconselham realizar medições de NO expirado na ausência de grande concentração de NO ambiente. Um achado significativo deste estudo foi a baixa concentração de NO nos fumantes em relação aos indivíduos não fumantes.

Visando complementar a pesquisa de GOMEZ *et al.* (1998), CORRADI *et al.* (1998) realizaram um estudo semelhante, porém com maior critério no controle de vieses, com 78 voluntários não fumantes, e obtiveram como resultado que, somente haveria diferenças significativas no ar exalado em concentrações ambientais de NO acima de 35 ppb. Os níveis normais de NO exalados ficaram em 13,8 ppb. Foi demonstrado que, mesmo na técnica de retardo expiratório, há uma contaminação inicial pelo NO nasal. Nos estudos de Corradi e colaboradores foram utilizadas sacolas feitas com um filme de poli-vinil (Tedlar, Estados Unidos). Ficou comprovado que estas sacolas especiais para gases eram uma excelente alternativa para o armazenamento do NO expirado, confirmando os achados de SATO *et al.* (1996).

SHINKAI *et al.* (2002) demonstraram haver diferenças significativas no NO expirado ao se aplicar um tempo de apnéia respiratória entre 10 e 20 segundos, anterior à expiração. Esta diferença, entretanto, não se manteve quando o tempo de apnéia era

superior a 20 segundos. Foram analisadas 10 pessoas saudáveis, com tempo de apnéia ótimo de 20 segundos e se encontrou uma concentração platô média de NO \pm 12,3 ppb.

SANCHEZ *et al.* (2001) compararam os níveis de NO expirado em 20 indivíduos saudáveis, de acordo com diferentes dietas e características antropométricas para se determinar se estas eram as causa da grande variabilidade dos valores normais de NO encontrados na literatura. Os níveis de NO expirados foram coletados 30 minutos antes de dietas específicas que eram compostas, respectivamente, por folhas verdes, peixes e carne, e em jejum. Depois de 30 minutos da ingestão de suas dietas, foram feitas 3 coletas de amostras expiratórias, cada uma com intervalo de 10 minutos. As amostras provenientes do jejum continham o menor nível de NO; sendo que o nível mais elevado foi após a ingestão de dieta de folhas verdes. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras coletadas nas diferentes dietas, bem como no índice de massa corporal ou no sexo. A importância deste trabalho também está no fato da comprovação da técnica de se utilizar um bocal de 2 cm de diâmetro para criar uma resistência expiratória, gerando uma pressão na cavidade oral entre 15 e 20 cmH₂O, durante a expiração. Os valores de NO adquiridos foram de 3 a 12,3 ppb.

2.2.2- Monóxido de Carbono

O CO existe na atmosfera como um gás poluente, produto da combustão incompleta de combustíveis que possuam Carbono em sua composição, e da oxidação de hidrocarboneto. Os níveis de CO no ar ambiente podem ser significantes e dependentes da estação do ano e da hora do dia, bem como do vento, tráfego, industrialização e altitude.

O CO, como o NO, atua nas ações biológicas musculares, neurais e no nível celular, como inibidor da agregação plaquetária. O CO é produzido em diferentes tecidos pela degradação da enzima heme-oxigenase. Duas formas de heme-oxigenase foram

caracterizadas, mas a relação com o CO exalado (eCO) ainda não foi definida (WAGENER *et al.*, 2003).

A inibição da NOS, enzima que produz NO a partir da arginina, parece ter efeitos marcantes sobre o monóxido de carbono, porém uma relação ainda não foi estabelecida (CHAPMAN *et al.*, 2001).

A medição do eCO em humanos era usada apenas como um indicador do hábito de fumar e envenenamento por CO. Em 1972, na Rússia, o eCO foi descrito pela primeira vez como marcador de doenças cardiovasculares, diabetes e nefrite (ZAYASU *et al.*, 1997).

Assim como o NO, o CO expirado possui diversas técnicas de análise, mas parece haver um consenso quanto ao método de coleta. Proposto por Jarvis, este método é muito similar à técnica de isolamento da cavidade nasal de KHARITONOV *et al.* (1996) para coleta do NO expirado. Na técnica de Jarvis, após uma expiração forçada até a capacidade residual final, é pedido que o paciente faça uma inalação até a capacidade pulmonar total, onde a expiração é retardada por 20 segundos. Após este tempo, expira-se rapidamente através de um tubo. Como descrito anteriormente, a finalidade deste tubo é de promover uma resistência, forçando a descida do palato mole, e assim, isolando qualquer contaminação proveniente da cavidade nasal. Este procedimento é repetido por três vezes, com um minuto de intervalo, em respiração tranqüila, entre as coletas.

ZAYASU *et al.* (1997) também utilizaram essa técnica numa pesquisa realizada com o objetivo de medir as alterações dos níveis de CO nos pacientes asmáticos. No grupo controles foram selecionados 30 indivíduos saudáveis não fumantes; enquanto que 60 pacientes asmáticos ficaram divididos em dois grupos, os com tratamento e os sem tratamento específico para a asma. ZAYASU e colaboradores (ZAYASU *et al.*, 1997) encontraram como resultado um valor médio do nível de CO expirado em torno de 1,5 ppm no grupo controle e 1,7 ppm no grupo de asmáticos tratados. As medidas se mostraram reprodutíveis em dias separados para os mesmos indivíduos, sendo que a variação dos níveis ficou em apenas 1,9 %. Já no grupo de asmáticos sem tratamento, os valores ficaram em torno de 5,6 ppm. Este estudo demonstrou como o CO expirado pode ser medido, de modo confiável, em indivíduos saudáveis. Foi então registrada a primeira evidência de que

o CO exalado era significativamente aumentado em pacientes asmáticos sem tratamento. Entretanto, esta pesquisa não se referiu à contribuição das vias aéreas superiores nos níveis de CO do ar exalado.

YAMAYA *et al.* (1998) investigaram o comportamento do CO nas afecções do trato respiratório superior. Dez voluntários saudáveis, não fumantes, foram submetidos à técnica de Jarvis, e resultados similares foram encontrados quanto ao nível normal do CO expirado – 1,2 ppm. Em 20 indivíduos, diagnosticados com inflamação do trato respiratório superior, foi encontrado um valor médio significativamente superior ao do grupo controle – 5,6 ppm. Uma relação dos níveis de CO com a severidade da doença foi sugerida. Examinou-se, também, a contribuição das vias aéreas superiores no CO expirado e foi encontrada uma diferença significativa na utilização ou não da resistência expiratória. A falta desta resistência mostrou um elevado aumento nos níveis de CO expirado, evidenciando uma significativa contribuição da cavidade nasal.

Utilizando uma técnica em que se empregava um tempo expiratório um pouco maior, entre 20 e 30 segundos, HORVATH *et al.* (1998) obtiveram valores mais elevados para os níveis de eCO_{em} em indivíduos saudáveis – 3,0 ppm. Uma característica desta pesquisa foi a de se colher amostras de CO ambiente antes dos experimentos, subtraindo estes níveis das concentrações encontradas das amostras dos pacientes. Este trabalho também demonstrou a elevada concentração de eCO em pacientes com bronquiectasia – 6,0 ppm.

ANTUNI *et al.* (2000) estudaram, com sucesso, a potencialidade da técnica de mensuração do CO expirado como indicador não invasivo de gravidade em pacientes com fibrose cística. Foram utilizados indivíduos saudáveis, pacientes estáveis de fibrose cística e pacientes agudizados. O CO ambiente também foi mensurado e subtraído dos valores médios individuais. Houve diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo de pacientes agudos, 2,0 ppm e 4,8 ppm, respectivamente. De acordo com os outros estudos, não houve diferenças do grupo controle para o grupo de pacientes estáveis – 2,7 ppm. Também se comprovou que a administração intravenosa de antibióticos reduz o nível expirado de CO para valores iguais aos do grupo de pacientes estáveis, em até sete dias.

Através do mesmo protocolo, MONTUSCHI *et al.* (2001) demonstraram um significativo aumento da concentração de CO exalados em pacientes com DPOC – 7,4 ppm. Os valores médios normais de eCO foram de 3,0 ppm. Montuschi e colaboradores (MONTUSCHI *et al.*, 2001) compararam achados de NO expirado com os de eCO, sem que conseguisse demonstrar uma relação entre os níveis expirados destes gases na DPOC. Foi preconizado que o CO refletiria apenas um dano oxidativo primário do processo inflamatório, sendo o NO um marcador mais geral da inflamação, da qual depende o grau de obstrução.

Em todos os estudos apresentados, indivíduos fumantes obtiveram altos índices de CO expirado, com variação entre 7,9 ppm e 21,6 ppm. Esta variação pode ser determinada pela falta de critério em relação à homogeneidade do grupo, isto é, ao número de cigarro por dia, ao tempo de uso e ao tempo de abstinência até a coleta. Mesmo assim, a forte influência do hábito de fumar nos níveis de CO e NO exalados pode ser um limitante do uso destes marcadores em fumantes (MONTUSCHI *et al.*, 2001).

ZEGDI *et al.* (2000) realizaram um estudo em que mostraram a estabilidade dos níveis de CO expirado em pacientes críticos mecanicamente ventilados. Segundo esta pesquisa, os níveis de eCO se mantêm estáveis na ventilação mecânica por um período de 4 a 7 horas, em pacientes hemodinamicamente estáveis. Outro achado importante é que a mudança abrupta dos níveis da concentração de oxigênio no ar inspirado (FiO_2), de 21% para 100%, é acompanhada por uma mudança nos níveis expirados de CO, que se elevaram de $\pm 0,64$ ppm até $\pm 1,41$ ppm, em quinze minutos. A partir daí, os níveis do eCO voltaram a se estabilizar, por um tempo de até 8 horas de experimento.

2.2.3- Outros Gases e Marcadores

ZARLING *et al.* (1987) detectaram pequenas quantidades de alcanos na respiração humana, e descreveram uma técnica de coleta e análise destes volumes, relacionando os etanos, propanos e pentanos. Neste estudo foram utilizadas sacolas de polietileno para coleta e elas preservaram as concentrações por um período acima de 10 horas.

KAZUI *et al.* (1992) induziram um processo inflamatório controlado em fígado de porcos vivos e, através da cromatografia gasosa, validaram o uso da medição do etano expirado como indicador sensível, específico e não invasivo de processos lesivos.

HABIB *et al.* (1995) determinaram os níveis de etano alveolares expirados em indivíduos saudáveis não fumantes e em fumantes imediatamente após o último cigarro, e a cada hora subsequente, até 3 horas. Foi demonstrado que o fumo aumenta os níveis basais de etano, em comparação com não fumantes.

LARSTAD *et al.* (2002) determinaram e validaram um método para o etano exalado, pentano e isopreno. O método foi baseado em pré-concentrações em um tubo sólido adsorvente, com amostras de 500 ml e analisado através da cromatografia gasosa. Os níveis expirados de pentano, etano e isopreno em indivíduos saudáveis (n = 4) foram 8,1 pmol/l, 11 pmol/l e 2,4 nmol/l, respectivamente. Segundo o autor, o método pode, com algumas modificações, ser usado para determinar moléculas de hidrocarbonetos no ar exalado.

NORWOOD *et al.* (1992) pesquisaram a eficácia do método de análise da amônia (NH₃) expirada na acidez bucal e de vias aéreas em humanos, e sua relação com os efeitos da poluição.

HANAZAWA *et al.* (2000) analisaram indiretamente a concentração de metabólitos do NO pela quantificação da nitrotirosina em pacientes asmáticos. Para isto foi usado um kit enzimático específico (EIA) (Cayman Chemical, Estados Unidos). Foi demonstrado que a nitrotirosina é detectável no condensado respiratório de indivíduos saudáveis (6,3 ng / ml)

e é significativamente aumentada em pacientes asmático sem tratamento (15,3 ng / ml). O NO expirado (eNO) foi medido através de quimiluminescência nos pacientes asmáticos e mostrou-se uma correlação entre o eNO e os níveis de nitrotirosina ($r = 0,65$, $p < 0,005$). Como conclusão, os autores relatam evidências de que a análise da nitrotirosina no condensado respiratório pode ser um marcador mais sensível do que o eNO, na análise da contribuição do estresse oxidativo na inflamação das vias aéreas de asmáticos.

BALINT *et al.* (2001) analisaram os níveis do NO_2^- , outro metabólito do NO, no condensado respiratório de fumantes através de uma reação química do nitrito com agentes fluorescentes. Após esta reação, o sinal fluorescente produzido era medido por um fluorômetro (Labtech, Inglaterra). Os achados mostraram que o ato de fumar pode aumentar os níveis de nitrito por meio do efeito oxidante induzido pela fumaça do cigarro, contribuindo no dano epitelial das vias aéreas.

CORRADI *et al.* (2001) utilizaram a interação do NO com a glutatona na formação do composto nitrosotiol (RS-NOs) para medir os níveis de inflamação nas vias aéreas. O RS-NOs foi medido através de um kit comercial de colorimetria (Oxonon, Estados Unidos). Nos resultados encontraram-se medidas elevadas de RS-NOs nos pacientes asmáticos (0,81 μM) em comparação com os indivíduos do grupo controle (0,11 μM). Também foi observado o elevado nível de RS-NOs em pacientes com fibrose cística (CF) (0,35 μM), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (0,24 μM) e em fumantes (0,46 μM). Apesar dos achados, o estudo não conclui se a medida do RS-NOs representa meramente uma resposta adaptativa ao estresse nitrosativo nas vias aéreas, ou se o RS-NOs desempenha um papel mais ativo na proteção das vias aéreas contra o estresse oxidativo.

NOWAK *et al.* (1996) estudaram os níveis de H_2O_2 em pacientes fumantes, com DPOC estável em comparação com indivíduos saudáveis. As medições foram feitas através de espectrofluorometria. O valor médio a concentração de H_2O_2 nos DPOCs estáveis foi dez vezes maior do que nos indivíduos saudáveis – 0,55 μM e 0,05 μM , respectivamente. Não houve diferenças significativas entre fumantes com DPOC (0,44 μM) e pacientes com DPOC que nunca fumaram (0,49 μM). Baseado neste achado, os autores sugeriram que o hábito de fumar não aumentaria a produção de H_2O_2 .

GUATURA *et al.* (2000) determinaram os níveis de H_2O_2 em indivíduos saudáveis após o fumo. As análises do H_2O_2 foram feitas através de uma reação enzimática com o composto tetrametilbenzidina (TMB). A reação final era analisada com um espectrofotômetro (Univicon, Suíça). Através da espectrofotometria, mostrou-se que os níveis basais de H_2O_2 nos indivíduos saudáveis ($0,74 \mu M$) não diferiram dos fumantes ($0,75 \mu M$). Após o fumo, o nível de H_2O_2 dos fumantes elevou-se, em meia hora, para $0,95 \mu M$. Contrariando aos achados de (NOWAK *et al.*, 1998), concluiu-se que o fumo aumenta o estresse oxidativo, elevando a produção de agentes reativos do oxigênio, contribuindo para o desenvolvimento de doenças associadas ao cigarro.

LOUKIDES *et al.* (2002) analisaram, com a mesma reação química do H_2O_2 com o composto tetrametilbenzidina (TMB), os níveis de H_2O_2 no condensado respiratório de pacientes asmáticos. A espectrofotometria gerou, como resultado, que o valor médio de H_2O_2 estava significativamente aumentado nos pacientes asmáticos ($0,67 \mu M$) em relação aos indivíduos saudáveis ($0,2 \mu M$). Segundo este estudo, o H_2O_2 é limitado em prever a severidade da doença, visto que depende se os pacientes estão, ou não, em tratamento com esteróides, pois este faz com que os níveis de H_2O_2 em asmáticos voltem a valores normais.

VAN BEURDEN *et al.* (2002) investigaram a sensibilidade e a reprodutibilidade da medição dos níveis de H_2O_2 no condensado respiratório e o efeito da estocagem sobre as concentrações de H_2O_2 de pacientes DPOCs estáveis. Após a coleta, as concentrações eram medidas fluorometricamente e o restante da amostra era guardado a $-70^\circ C$ por períodos de 10, 20 e 40 dias. Os autores relatam que não houve diferenças significantes entre as análises, sendo determinado que as concentrações de H_2O_2 podem permanecer estáveis por até 40 dias, sob congelamento.

CARPENTER *et al.* (1998) analisaram os níveis de isoprostanos (8-Isoprostano) em pacientes com SDRA através da cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC/MS). Os resultados mostraram que os níveis de 8-Isoprostano em pacientes com SDRA (87 pg/ml) foram significativamente elevados do que nos indivíduos saudáveis (7 pg/ml). Um achado importante foi que, neste estudo, os mesmos pacientes eram ventilados

com diferentes níveis de FiO_2 , e, apesar disto, as concentrações de 8-Isoprostano não variaram com a fração de oxigênio inspirado.

KOSTIKAS *et al.* (2002) mediram os níveis de pH em pacientes com doenças inflamatórias das vias aéreas, correlacionando-os com o 8-Isoprostano e o H_2O_2 . Os níveis de 8-Isoprostano e de pH foram determinados através de kits enzimáticos comerciais (Cayman Chemical, Estados Unidos); assim como o H_2O_2 (Sigma Chemicals, Estados Unidos). Os níveis de pH mostraram-se diminuídos em pacientes com DPOC (7,16) e com bronquiectasia (7,11) em relação aos pacientes com asma (7,43) e aos indivíduos saudáveis (7,47). Encontrou-se uma forte correlação negativa entre os níveis de pH e de H_2O_2 ($r = -0,74$, $p < 0,0002$) em pacientes com DPOC. Não houve correlação entre os níveis de pH e os de 8-Isoprostano em DPOCs. Nos pacientes asmáticos houve correlação negativa com o H_2O_2 ($r = -0,71$, $p < 0,0001$) e com o 8-Isoprostano ($r = -0,55$, $p < 0,0002$). Em conclusão, os autores determinaram como sendo crítica a consideração do pH endógeno quando se analisar as inflamações das vias aéreas em doenças pulmonares inflamatórias.

A medição de uréia na respiração vem sendo usada na prática clínica como importante método não invasivo de detecção da inflamação bacteriana. Foi demonstrado que elevados níveis de uréia podem condizer com o estresse oxidativo. É possível, também, que a medição da amônia exalada possa diferenciar infecções virais e bacteriais em doenças pulmonares (GISBERT *et al.*, 2004) e (MALFERTHEINER *et al.*, 2002).

Ainda são raros os trabalhos publicados na literatura sobre a influência de outros gases exalados nas doenças inflamatórias, mas os trabalhos já divulgados seguem o mesmo caminho dos estudos relativos aos NO e CO expirados, com ênfase em doenças como a asma e a fibrose cística.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Materiais para a Coleta

3.1.1 - Sacolas para Gases

A coleta e armazenagem dos gases exalados foram realizadas em sacolas especiais (SCK, Estados Unidos), feitas de Tedlar (Dupont, Estados Unidos), modelo 232-01, com capacidade de armazenagem de 1 litro e válvula única, de torção manual. Como o Tedlar é uma película inerte e resistente a permeabilização dos gases, estas sacolas são produzidas especificamente para o armazenamento e transporte de amostras gasosas e, previamente, se mostraram ser armazenadores estáveis para gases exalados (MASSARO *et al.*, 1996). A válvula única de entrada e saída do ar, feita de polipropileno, mantém sua vedação, evitando vazamentos e contaminações da amostra. A válvula possui um septo de Teflon (Dupont, Estados Unidos), material quimicamente inerte, para a retirada ou inserção de amostras gasosas. Segundo o fabricante, a amostra gasosa armazenada nestes recipientes mantém suas propriedades por um período superior a 48 horas (ANÔNIMO, 2001).

Para ratificar a estabilização dos gases durante o período de armazenagem, duas sacolas foram preenchidas com ar expirado de dois indivíduos saudáveis, um fumante e outro não fumante, segundo os critérios de Jarvis (KHARITONOV *et al.*, 1996) para coleta de ar expirado, descritos anteriormente. Uma terceira sacola foi preenchida com ar proveniente do compressor de ar modelo VS-300 (Barionkar, Brasil) do laboratório I-140 do Bloco I, COPPE/UFRJ, e a seguir, tiveram parte de seus conteúdos analisados. As sacolas, com o restante das amostras não analisadas, foram guardadas em local fechado por um período aproximado de 48 horas. Após este tempo, ocorreu nova análise do conteúdo amostral remanescente das sacolas. A Tabela 2 indica as concentrações do CO de cada amostragem e suas áreas, nos dois momentos da análise.

Tabela 2 - Concentrações do CO de cada amostra, com suas respectivas áreas e momentos da análise.

Amostras	Análise 1		Análise 2	
	Área 1	Concentração 1 (ppm)	Área 1	Concentração 2 (ppm)
Amostra 1	32	3	41	3
Amostra 2	60	6	69	7
Amostra 3	151	12	128	12

Amostra 1 representa o ar do compressor de ar (Barionkar, Brasil) do laboratório I-140 do bloco I da COPPE/UFRJ. Amostras 2 e 3 representam o ar expirado de dois indivíduos saudáveis, um não fumante e um tabagista, respectivamente. Entre as análises 1 e 2, decorreram, aproximadamente, 48 horas. A Concentração está representada em ppm.

3.1.2 - Seringas de Vidro

Utilizou-se uma seringa de vidro hipodérmica BD Multifit (Becton Dickinson, Brasil), com capacidade nominal de 10 ml. A seringa dispunha de um batente em sua capacidade máxima e bico central com conexão Luer-Lok de metal. A seringa de vidro tem a vantagem de não ser porosa, como as seringas de plástico, e por isso, não reter partículas gasosas em sua parede. A seringa não foi lubrificada.

3.1.3 - Adaptador para Coleta do Gás Exalado

Foi desenvolvido, no Laboratório de Engenharia Pulmonar, um adaptador para a coleta dos gases expirados (Figura 5). Este dispositivo foi projetado para que as coletas

fossem realizadas sem alterações nas pressões internas do sistema, como a pressão positiva ao fim da expiração (PEEP), e sem a contaminação do ar exalado pelo ar ambiente.

O adaptador foi conectado ao circuito expiratório do ventilador, após o coletor de umidade (Figuras 6 e 7). Este coletor é uma peça integrante do circuito expiratório do ventilador e tem como função reter o condensado do vapor d'água do ar expirado.

Neste adaptador para coleta de gases foram acopladas, através de tubos de silicone, as seringas de vidro para a retirada do ar do circuito expiratório, uma sacola especial para gases Tedlar e duas válvulas de três vias, que, quando combinadas, promovem o direcionamento do fluxo para a seringa e, posteriormente, desta para a sacola. Esta associação de válvulas de três vias também impede o escape do ar coletado para o ambiente e o seu retorno para o circuito ventilatório (Figura 7 e 9).

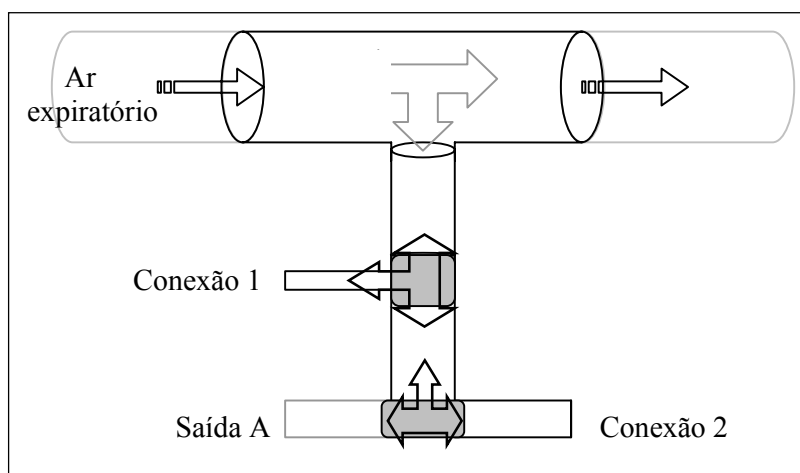


Figura 5 – Diagrama do adaptador para coleta dos gases expirados. A sacola de gases conecta-se à Conexão 1 e a seringa à Conexão 2. A saída A pode ser aberta para o ambiente, e serve para desprezar o ar da seringa sem contaminar o conteúdo da sacola ou influenciar o fluxo expiratório do animal.

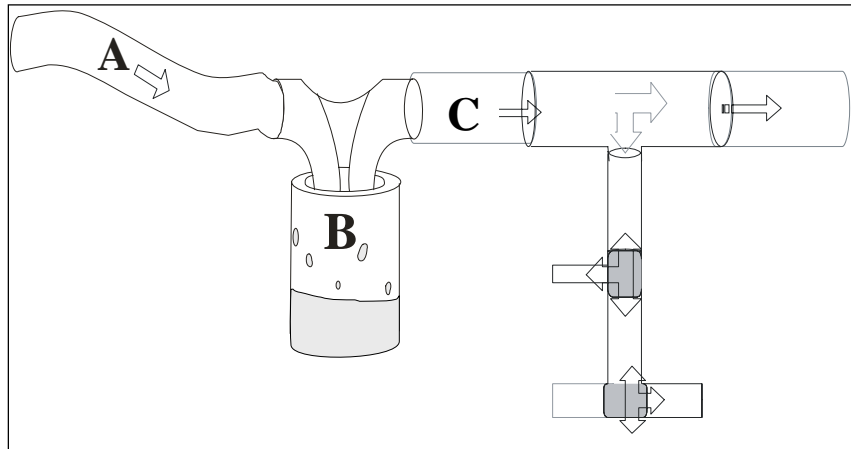


Figura 6 – Diagrama mostrando o coletor de umidade e o adaptador utilizado para a coleta do ar expirado. Em A: o ar proveniente do ramo expiratório, saturado de vapor d'água é direcionado para o coletor. (B): No coletor, o excesso de condensado do vapor d'água é retido e, em C, o ar pode ser aproveitado para a amostragem.



Figura 7 – Fotografia da montagem do adaptador para coleta dos gases expirados e suas conexões: o ramo expiratório e o coletor de umidade.

3.1.4 - Tubos conectores

Como o plástico é um material poroso, os acessórios plásticos podem ficar contaminados com moléculas dos gases, deixando resíduos em coletas futuras. Por este motivo, foram utilizados tubos conectores de silicone na montagem do adaptador e nas conexões dos cromatógrafos. Além de não ser poroso, o silicone é uma substância inerte, isto é, não reage e não desencadeia nenhuma reação quando em contato com as moléculas gasosas.

3.2 – Montagem Inicial

No início de cada experimento, realizou-se a lavagem da seringa de vidro com ar comprimido seco. Esta lavagem foi feita enchendo e esvaziando a seringa, por pelo menos 10 repetições, para evitar que algum resíduo de amostragens anteriores pudesse contaminar o novo experimento.

Uma lavagem individual das sacolas para gases também foi realizada antes das coletas, preenchendo-as com ar comprimido e, a seguir, esvaziando seu conteúdo até a totalidade. Através do acoplamento individual de cada sacola a um sistema composto de tubos de silicone, uma válvula de três vias e uma seringa BD 60 ml (Becton Dickinson, Brasil) com bico Luer-Lok e anel de retenção, foi possível esvaziar o conteúdo das sacolas até a totalidade. Este procedimento foi repetido pelo menos cinco vezes para cada sacola, de acordo com as especificações do fabricante (ANÔNIMO, 2000b). Ao final de cada experimento, após a análise do conteúdo no cromatógrafo, repetia-se a lavagem das sacolas, que eram, então, guardadas completamente vazias.

3.3 – Seleção e Preparação Animal

O protocolo experimental foi desenvolvido para a obtenção de gases exalados por fêmeas de suínos Landrace/Large White. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ), processo número P0165-03.

O sistema para coletas de gases exalados foi incorporado aos experimentos de controle automático da ventilação mecânica, em porcos ventilados artificialmente, com peso médio de 19 kg (± 2 kg), realizados no Laboratório de Engenharia Pulmonar (LEP) do Programa de Engenharia Biomédica (PEB) da COPPE/UFRJ (PINO, 2004).

O trabalho de PINO *et al.* (2004) teve como objetivo desenvolver e testar um sistema de controle automático que monitorasse e ajustasse os parâmetros de um ventilador pulmonar comercial, em um modelo animal de SDRA induzido por ácido oléico, como descrito posteriormente. Neste trabalho, os animais eram separados em dois grupos, distintos apenas na forma de ventilação pulmonar. O grupo denominado “Manual” tinha sua forma de ventilação protetora, seguindo as sugestões do Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. O grupo “Automático” também mantinha uma ventilação protetora, com a diferença de incorporar o ajuste automático do Volume Corrente e da PEEP, visando minimizar a lesão ao tecido pulmonar através da correção destes fatores de forma automática e dinâmica (PINO *et al.*, 2004).

Os grupos Manual e Automático eram compostos de 6 animais cada, sendo que deste total, 10 animais foram examinados quanto ao eCO, 6 do grupo Automático e 4 do grupo Manual. Os 10 animais examinados quanto ao eCO, caracterizados pela lesão pulmonar induzida, foram alocados, no presente trabalho, para o designado grupo SDRA.

Nestes experimentos, os animais, previamente anestesiados com cis-quetamina (10 mg/Kg), cloridrato de midazolam (0,5 mg/Kg) e atropina (0,04 mg/Kg), foram posicionados numa mesa cirúrgica com calha, em decúbito dorsal. Um cateter flexível fornecia o acesso, via veia auricular, a uma infusão contínua de cis-quetamina a 10 mg/Kg/h.

Os animais foram entubados com um tubo endotraqueal de diâmetro interno entre

6,0 e 7,0 mm e conectados, através de uma traquéia flexível, a um ventilador Amadeus (Hamilton Medical, Suíça), em modo de ventilação com volume controlado, com FiO_2 de 1,0, PEEP de 5 cmH_2O , volume corrente entre 6 e 9 ml/Kg e uma frequência respiratória entre 20 e 30 ciclos por minuto. Em seguida, os animais foram paralisados, com uma infusão contínua de brometo de pancurônio a 2 mg/Kg/h, através de um acesso por cateter flexível na veia femoral. Bombas de infusão MiniMax (Hartmann, Brasil) foram utilizadas para as infusões contínuas de cis-quetamina e de brometo de pancurônio. A anestesia foi realizada e monitorizada por médicos veterinários anestesistas. Uma gasometria era realizada para verificar os níveis de pH, $PaCO_2$ e PaO_2 , e então, a indução da SDRA era realizada.

A SDRA foi induzida por uma infusão intravenosa de Ácido Oléico super puro (MERCK, Alemanha) com dose inicial de 0,05 ml/Kg, diluídos em 10 ml de sangue e, quando necessário, doses suplementares de 0,025 ml/Kg eram infundidas até ser confirmada a presença de injúria pulmonar por uma gasometria arterial, quando a PaO_2 se mostrava abaixo de 200 mmHg. Somente após a caracterização da lesão os animais eram separados, pelo critério de ventilação, nos grupos Manual e Automático. Para o grupo CONTROLE foram selecionados 2 animais normais, sem lesão pulmonar induzida e ventilados de forma similar ao grupo SDRA.

3.4 – Medições

3.4.1 - Fluxo

O sinal de fluxo foi medido por um pneumotacógrafo de membrana variável para ventilador Amadeus (Hamilton Medical, Suíça) acoplado a um transdutor de pressão 176PC07HD2 do módulo de transdutores para mecânica respiratória (MOTRAMERE) n°. 007 (PEB/COPPE/UFRJ, Brasil).

3.4.2 – Pressão de Vias Aéreas e Esofágica

A medida do sinal de pressão de vias aéreas foi realizada por um transdutor 163PC01D48 (Honeywell, Estados Unidos) e a medida do sinal de pressão esofágica por um transdutor 143PC01D (Honeywell, Estados Unidos), ambos do MOTRAMERE n°. 007. Uma linha de base, correspondente à pressão 0 cmH₂O foi medida antes de cada experimento.

Para a medida da elastância pulmonar, foi utilizado um balão esofágico (Ackrad Laboratories, Estados Unidos), que, após lubrificação com Xilocaína, era inserido, vazio e com a ajuda de uma guia metálica interna, até o processo xifóide esternal. Depois de posicionado a guia metálica era retirada, e o balão insuflado com 5 ml de ar, seguido de um esvaziamento de 3 ml. Com o balão cheio, o mesmo era puxado, lentamente, no sentido da retirada, até que o sinal de pressão esofágica pudesse ser visto no monitor de sinais. A pressão esofágica era comparada à pressão de boca, com o sistema respiratório ocluído e através de uma manobra de expiração forçada passiva, que era obtida pela compressão manual do tórax do animal, conforme a técnica de Baydur *et al.* (1987) (BAYDUR *et al.*, 1987).

3.4.3 – Monitorização Complementar

Durante o experimento foram monitorizados os parâmetros de pressão arterial do animal, através de um transdutor P23Db (Gould Staham, Estados Unidos).

As pressões parciais dos gases O₂, CO₂ e N₂ foram monitorizadas por um espectrômetro de massa respiratório MGA 2000 (Airspec, Inglaterra).

As conexões que fazem parte do sistema entre o tubo endotraqueal e o ventilador são mostradas na Figura 8.

A medida da saturação de pulso de oxigênio foi realizada por um oxímetro de pulso

COSMO (Dixtal, Brasil), e o sensor foi posicionado na orelha, língua ou na cauda do animal.

A PaO_2 , PaCO_2 e o pH sanguíneo foram coletados por via arterial e analisados por um analisador portátil i-STAT PCA (Abbott, Estados Unidos), que utilizava cartuchos EG7+ (Abbott, Estados Unidos).

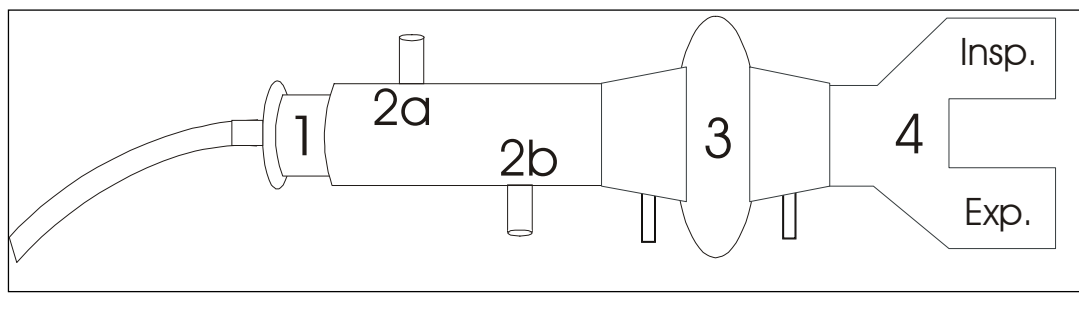


Figura 8 – Conexões entre o tubo endotraqueal (1) e o “Y” do ventilador (4), destacando as saídas para o espectrômetro de massa (2a), o transdutor de pressão de vias aéreas (2b), e o sensor de fluxo do ventilador (3). Veja o texto para uma explicação detalhada.

3.5 – Aquisição dos Sinais e Processamento

A aquisição dos sinais foi realizada através do programa de aquisição e processamento DAS, desenvolvido no Laboratório de Engenharia Pulmonar - COPPE/UFRJ (PINO *et al.*, 2004). As informações de mecânica pulmonar, como a elastância, foram armazenadas em um arquivo de dados durante o tempo de duração de cada coleta do eCO, e foram anotados os parâmetros do ventilador artificial, como volume corrente e PEEP.

Posteriormente, a análise dos dados foi realizada no programa MECÂNICA, que é uma ferramenta com funções para a mecânica respiratória, desenvolvido em linguagem Matlab 5.2, no Laboratório de Engenharia Pulmonar - COPPE/UFRJ, e que também possui a função de processar os sinais coletados pelo DAS (PINO *et al.*, 2004).

3.6 – Análise dos Níveis Celulares do LBA

Em três animais do grupo SDRA, houve coletas do LBA para análise da celularidade, de acordo com o seguinte procedimento: 1) Introdução e posicionamento de um cateter de mini-LBA, modelo Combicath (Prodimed Division Plastimed, França), em brônquio subsegmentar; 2) Instilação de 10 ml de solução salina, a 0,9%; 3) Aspiração do material; 4) Armazenagem; 5) Filtragem em gaze estéril.

A análise do LBA foi realizada por uma equipe do Laboratório de Imunofarmacologia do Depto. de Fisiologia e Farmacodinâmica da Fundação Oswaldo Cruz - RJ.

3.7 - Aquisição das Amostras

No início de cada experimento uma bolsa era preenchida com o gás O₂ proveniente da rede de gases do laboratório I-140, e seu conteúdo também era analisado posteriormente.

Após decorridos pelo menos quinze minutos do início da ventilação mecânica, com a fração inspirada de O₂ (FiO₂) em 1,0, realizava-se a primeira coleta do gás expirado do animal. O ar expirado era retirado do circuito através da seringa, cujo êmbolo era arrastado até o volume de 10 ml (batente).

Girando a primeira válvula de três vias do adaptador para coleta dos gases expirados, fechava-se a via Ramo expiratório – Seringa, e o ar que estava aprisionado na seringa era transferido para a sacola. Após isto, girava-se novamente a válvula, e a conexão da sacola era fechada, deixando o ar amostral aprisionado em seu interior. Quando a via Sacola – Seringa era fechada, reabria-se a via Ramo expiratório – Seringa (Figura 9). Este procedimento foi repetido sessenta vezes para cada sacola. Então, ao fim desta amostragem, as sacolas se encontram preenchidas com, aproximadamente, 600 ml de ar expirado.

Para não aceitar refluxo do ar no interior do sistema de coleta, as válvulas de três vias eram posicionadas para permitir a coleta somente do gás proveniente do ramo expiratório do circuito do ventilador e, posteriormente às coletas, as válvulas de três vias do adaptador eram posicionadas de forma que o ar colhido não retornasse ao circuito.

Para minimizar os efeitos da mistura do O_2 , proveniente do ramo inspiratório e do espaço morto, com o ar alveolar, as coletas do ar exalado do animal eram efetuadas ao final da expiração, com vazão zero, ou próxima a zero.

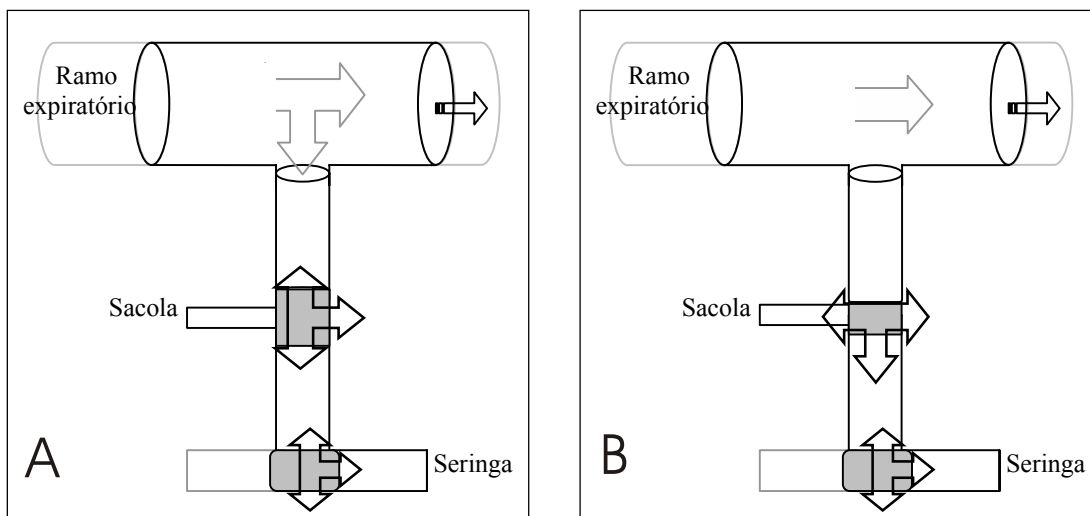


Figura 9 – Diagrama mostrando o procedimento de coleta do ar expirado. Em (A): o gás proveniente do ramo expiratório, ao se puxar o êmbolo, é direcionado para a seringa. A via Sacola - Seringa está fechada para evitar contaminação e escape do gás amostrado. Em (B): A via Ramo expiratório - Seringa é fechada e o gás contido na seringa é transferido para a sacola, sem contaminação do conteúdo da amostra.

As coletas foram realizadas em intervalos aproximados de uma hora e, ao final do experimento, havia um total de oito amostras de gases expirados para a análise, sendo que as três primeiras coletas eram realizadas sempre antes do estabelecimento da injúria pulmonar. Os momentos da coleta dos parâmetros estão indicados na tabela 3.

Tabela 3 - Instantes de tempo das coletas do ar expirado, das medidas da mecânica e das gasometrias.

Amostras \ Parâmetros	Tempo aproximado após lesão (horas)							
	-2	-1	0	1	2	3	4	5
Ar expirado	X	X	X	X	X	X	X	X
Mecânica		X	X	X	X	X	X	X
Gasometria		X	X*	X	X	X	X	

Amostras são indicadas por X; o Tempo 0 corresponde ao instante imediatamente anterior à injúria pulmonar, exceto no caso da gasometria, onde o X* corresponde à gasometria de confirmação da injúria pulmonar.

3.8 – Materiais para Análise

Os conteúdos gasosos das bolsas foram analisados no laboratório do Núcleo de Catálise da Engenharia Química da UFRJ (NUCAT), num período não superior a 48 horas a partir das coletas.

3.8.1 – Cromatógrafo I

Foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso provido de um analisador por condutividade térmica GC 17A (Shimadzu, Estados Unidos). Neste cromatógrafo foi acoplada uma coluna CP-Carboplot P7 (Varian, Estados Unidos).

Os parâmetros da coluna foram ajustados para uma temperatura de 50° C, a pressão da coluna em 50 KPa, o fluxo do gás de arraste em 100 ml/min e split 1:1. As caracterizações do pico de CO foram baseadas na biblioteca cromatográfica do fabricante para parâmetros ideais de separação e detecção de picos específicos (ANÔNIMO 2000a). Foi utilizado o Hélio (He) como gás de arraste, em isoterma, e com a corrente do detector no padrão de 91 mA.

O cromatógrafo GC 17A é integrado a um computador pessoal equipado com o programa CLASS-GC10, V. 2.0.0 (Shimadzu, Estados Unidos), que analisa os sinais e gera o cromatograma das moléculas presentes na amostra.

3.8.1.1 - Validação dos Parâmetros

Após 40 minutos de passagem do gás de arraste para estabilização e limpeza da coluna, amostras de concentrações conhecidas foram injetadas no cromatógrafo para confirmar se os parâmetros estavam de acordo para a análise do CO em níveis de ppm.

As amostras com concentrações conhecidas foram obtidas pela diluição do gás CO a 5,0% com O₂ a 100%. Os gases foram coletados diretamente da linha da malha de gases do NUCAT/UFRJ e, com o auxílio do programa DilCalc 2.13 (ChemSW, Estados Unidos), foi possível calcular a diluição exata para cada nível de CO pretendido. A Tabela 4 indica os tempos dos picos cromatográficos do CO, as áreas e as concentrações de cada amostragem. A concentração diluída de CO das amostras foi comparada com a concentração de CO analisada pelo cromatógrafo, em cada amostragem (Figura 10).

Tabela 4 - Indicação dos tempos dos picos cromatográficos do CO, as áreas e as concentrações de cada amostragem.

Concentração da Amostra (ppm)	Tempo (min)	Área	Concentração Medida (ppm)
CO – 500	2,458	561	498
CO – 10	2,442	115	11
CO – 5	2,392	55	5
CO – 1	2,384	14	1
eCO	2,399	29	3

A última amostra, denominada “eCO” caracteriza uma amostra de gás expirado de um indivíduo saudável, não fumante, coletada segundo a técnica de Jarvis. Ver o texto para mais detalhes. Valores intermediários foram omitidos.

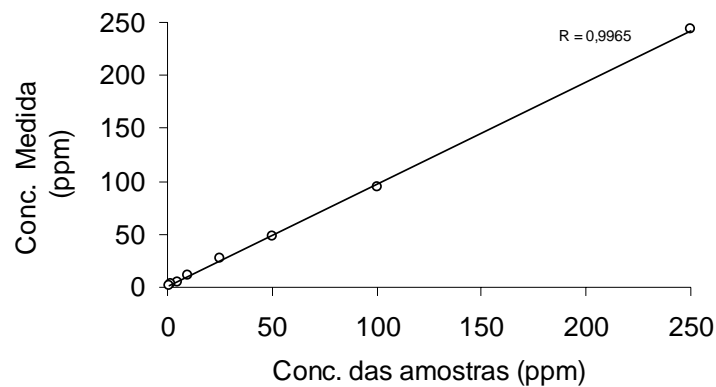


Figura 10 - Gráfico da relação entre as concentrações das amostras de CO, utilizadas para validação dos parâmetros da coluna, e as concentrações do CO analisadas no cromatógrafo GC-17A. Concentração Medida é a concentração analisada pelo cromatógrafo, Concentração das amostras é a concentração diluída de cada amostra.

3.8.2 - Cromatógrafo II

Por um problema técnico no equipamento utilizado, que resultou na quebra da coluna cromatográfica, o eCO dos animais do grupo controle foi analisado em um cromatógrafo gasoso CP-4900 Micro-GC (Varian, Estados Unidos), equipado com uma coluna Carboplot-Q (Varian, Estados Unidos). Os parâmetros da coluna foram ajustados para uma temperatura de 39° C, a pressão da coluna em 180 KPa, o fluxo do gás de arraste em 100 ml/min. As caracterizações dos picos foram baseadas na biblioteca cromatográfica do fabricante para parâmetros ideais de separação e detecção do pico de CO (LUONG 2002). Foi utilizado o Hélio (He) como gás de arraste, em isoterma.

O cromatógrafo CP-4900 Micro-GC é integrado a um computador pessoal equipado com o programa Star Workstation, V. 5.0 (Varian, Estados Unidos), que analisa os sinais e gera o cromatograma.

3.8.1.2 - Validação dos Parâmetros

O método de diluição e análise de concentrações conhecidas de CO, descrito anteriormente para o cromatógrafo GC 17A, também foi adotado para verificar a viabilidade da análise do eCO em níveis de ppm neste equipamento. A tabela 5 indica os tempos dos picos cromatográficos do CO, as áreas e as concentrações de cada amostragem. A concentração diluída de CO das amostras foi comparada com a concentração de CO analisada pelo cromatógrafo, em cada amostragem (Figura 11).

Tabela 5 - Indicação dos tempos dos picos cromatográficos do CO, as áreas e as concentrações de cada amostragem.

Concentração da Amostra (ppm)	Tempo (s)	Área	Concentração Medida (ppm)
CO - 500	0,920	19277	495
CO - 20	0,916	997	22
CO - 10	0,917	566	10
CO - 5	0,916	219	4,9
CO - 1,5	0,922	74	1,5

Valores intermediários foram omitidos.

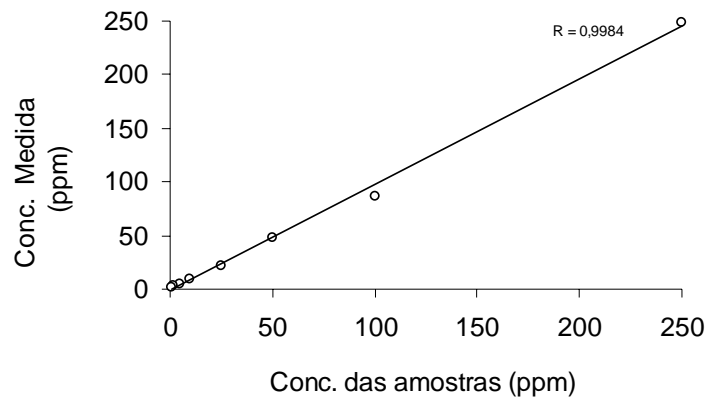


Figura 11 - Gráfico da relação entre as concentrações das amostras de CO, utilizadas para validação dos parâmetros da coluna, e as concentrações do CO analisadas no cromatógrafo CP-4900 Micro-GC. Concentração Medida é a concentração analisada pelo cromatógrafo, Concentração das amostras é a concentração diluída de cada amostra.

3.9 – Análise das Amostras

Anteriormente aos experimentos, uma concentração conhecida de CO era injetada no cromatógrafo para identificar a posição do pico cromatográfico do CO.

Após 40 minutos de passagem do gás de arraste para estabilização e limpeza da coluna, uma amostra do gás de cada sacola era inserida no cromatógrafo, com um fluxo constante de 15 ml/min. A primeira sacola a ter seu conteúdo analisado era a do gás proveniente do circuito do O₂, em seguida, os demais conteúdos eram analisados, adotando-se a mesma ordem da coleta. Ao final de cada análise e após a estabilização do cromatógrafo, a amostragem era repetida, fazendo com que cada sacola gerasse dois arquivos. As concentrações do O₂, CO e CO₂ dos arquivos de cada sacola eram anotadas e um valor médio foi utilizado.

3.9.1. - Correção dos Níveis de eCO

Devido ao mecanismo de manutenção da PEEP do ventilador, havia uma contaminação do ar expirado pelo O₂ proveniente do ramo inspiratório. Outro fator que sustenta esta contaminação era a comunicação dos ramos inspiratório e expiratório no “Y”, pois não existia, neste local, uma válvula unidirecional que evitaria esta mistura. Por esta razão, o ar amostrado do ramo expiratório contém um valor médio dos gases expirados, misturados com o O₂ proveniente do ramo inspiratório e do espaço morto.

Baseado nestas informações, um programa denominado TEGRAL, em linguagem Matlab, foi desenvolvido para calcular um valor de eCO mais próximo dos níveis de eCO alveolar (Anexo I). Para isso, a partir das informações armazenadas pelo programa MECANICA referentes ao intervalo de coleta do eCO, este programa tinha a função de: 1) Selecionar o trecho do arquivo correspondente ao período da coleta de eCO; 2) Coletar as informações expiratórias do gás CO₂, do fluxo e do volume para cada ciclo; 3) Calcular o

fluxo médio de CO₂ expiratório para o trecho selecionado; 4) Subtrair o volume do espaço morto do volume expirado, em cada ciclo; 5) Calcular o Volume médio de CO₂ expirado para o trecho selecionado.

O valor do CO₂ calculado pelo programa foi comparado com o nível analisado pela análise cromatográfica. A taxa entre os valores calculado e analisado de CO₂ foi utilizada para a correção dos valores do eCO medidos no cromatógrafo, para a respectiva amostra.

O nível de eCO calculado em cada amostra, para um dado experimento, foi subtraído do nível de CO encontrado na amostra de O₂ do respectivo experimento, sendo este novo valor usado para os cálculos.

3.10 - Análise das Informações

Para determinar se houve influência da forma de ventilação no eCO, os níveis de eCO entre os grupos Manual e Automático do trabalho de Pino *et al.* (2004) foram comparados.

Para analisar se houve alteração no eCO provocado por fatores externos, o nível de eCO do grupo Controle foi analisado.

Devido ao pequeno número de experimentos no grupo controle, para ratificar a estabilidade do eCO durante a ventilação artificial pré injúria pulmonar, foram comparadas, no Grupo SDRA, a primeira amostra de cada experimento com a amostra imediatamente anterior à injúria pulmonar.

Para demonstrar o comportamento do eCO na injúria pulmonar, foram comparadas, no grupo SDRA, as amostras anteriores à lesão pulmonar com a amostra da última coleta, após a injúria.

Nos três animais do grupo SDRA onde houve coleta do LBA, o nível de Neutrófilos foi comparado aos valores do eCO, com o objetivo de analisar a relação entre os resultados deste procedimento de monitorização da inflamação pulmonar com o eCO.

No grupo SDRA, para analisar a relação entre a mecânica pulmonar e eCO, a elastância pulmonar foi comparada com os níveis de eCO.

Os dados estatísticos, dos valores entre os grupos, estão apresentados em seus valores médios e comparados pelo teste estatístico de Wilcoxon. Para se testar a relação entre as variáveis, foi aplicado um teste de correlação de Pearson. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 – Resultados

Foram realizados doze experimentos em que se monitorou os níveis de CO expirados conforme descrito anteriormente, sendo dez experimentos no grupo SDRA e dois experimentos para o grupo controle. Após análise, geraram-se os seguintes resultados no grupo SDRA:

4.1- Animal 1, experimento realizado em 25 de junho. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 12.

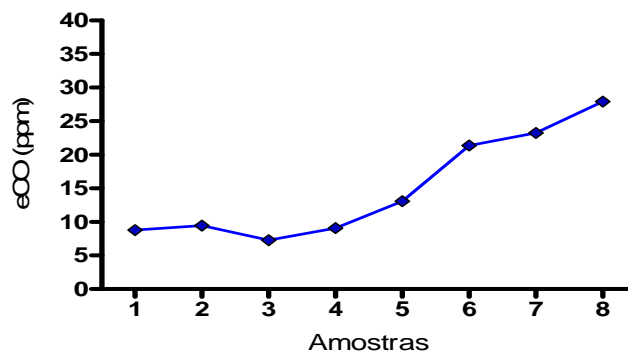


Figura 12 – Evolução dos níveis de eCO do Animal 1, ao longo do tempo.

4.2- Animal 2, experimento realizado em 02 de julho. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 13.

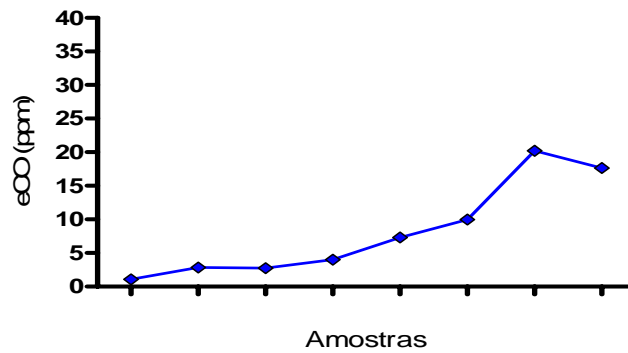


Figura 13 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 2, ao longo do tempo.

4.3- Animal 3, experimento realizado em 09 de julho. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 14.

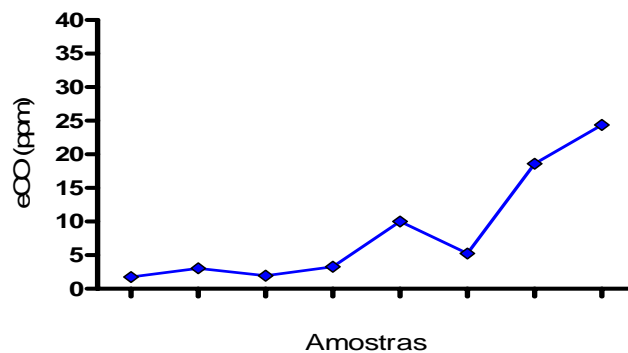


Figura 14 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 3, ao longo do tempo.

4.4- Animal 4, experimento realizado em 24 de setembro. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 15.

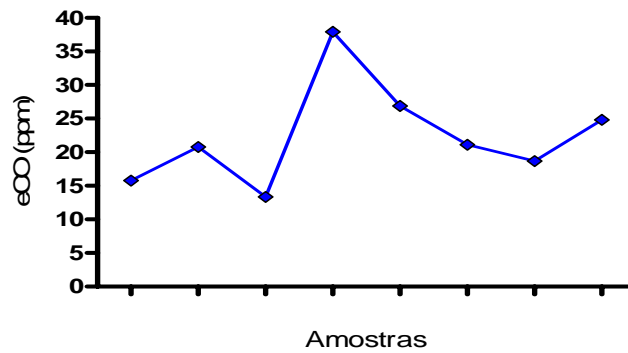


Figura 15 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 4, ao longo do tempo.

4.5- Animal 5, experimento realizado em 10 de outubro. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 16.

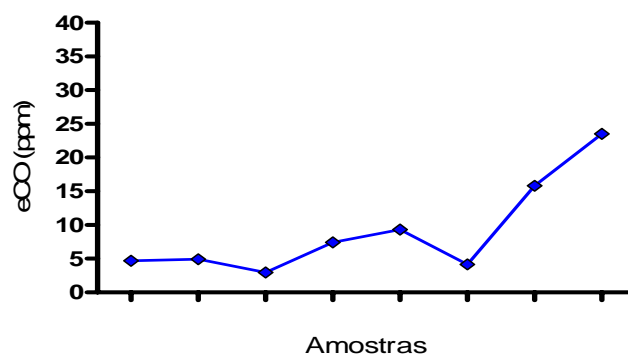


Figura 16 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 5, ao longo do tempo.

4.6- Animal 6, experimento realizado em 14 de outubro. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 17.

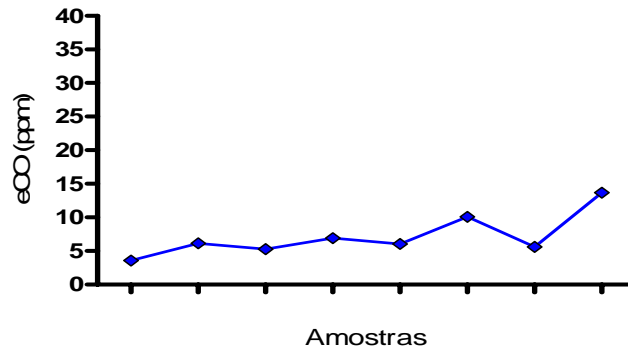


Figura 17 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 6, ao longo do tempo.

4.7- Animal 7, experimento realizado em 17 de outubro. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 18.

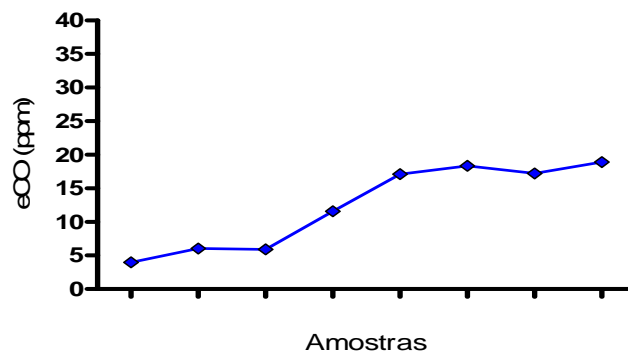


Figura 18 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 7, ao longo do tempo.

4.8- Animal 8, experimento realizado em 04 de novembro. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 19.

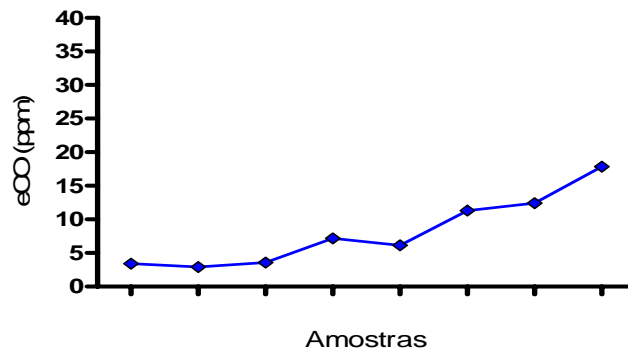


Figura 19 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 8, ao longo do tempo.

4.9- Animal 9, experimento realizado em 07 de novembro. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 20.

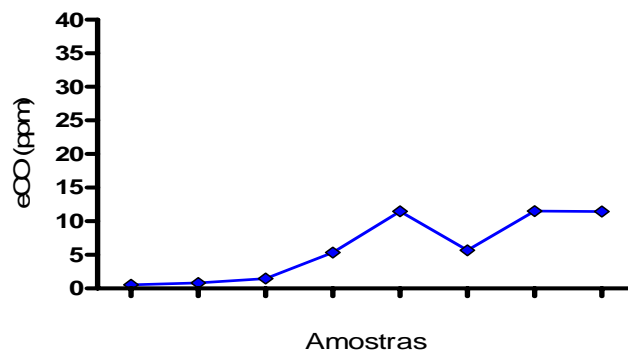


Figura 20 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 9, ao longo do tempo.

4.10- Animal 10, experimento realizado em 04 de dezembro. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 21.

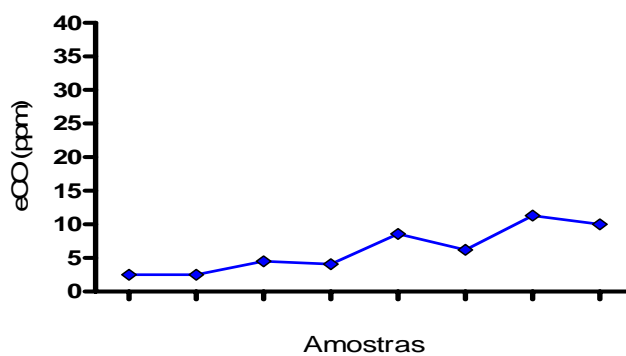


Figura 21 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 10, ao longo do tempo.

A análise dos experimentos realizados com os dois animais, alocados no grupo CONTROLE, geraram os seguintes resultados:

4.11- Animal 1, experimento realizado em 27 de abril de 2004. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 22.

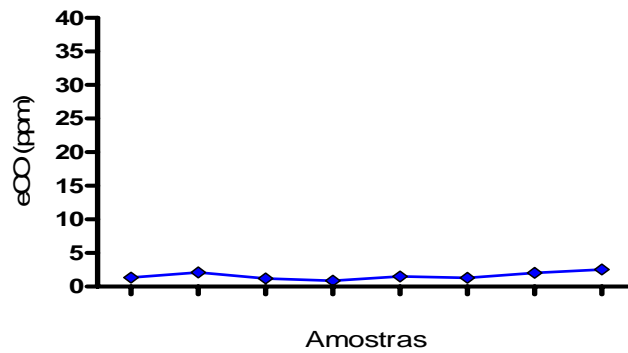


Figura 22 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 1 do Grupo Controle, ao longo do tempo.

4.12- Animal 2, experimento realizado em 03 de maio de 2005. Os níveis de eCO ao decorrer do experimento são mostrados na figura 23.

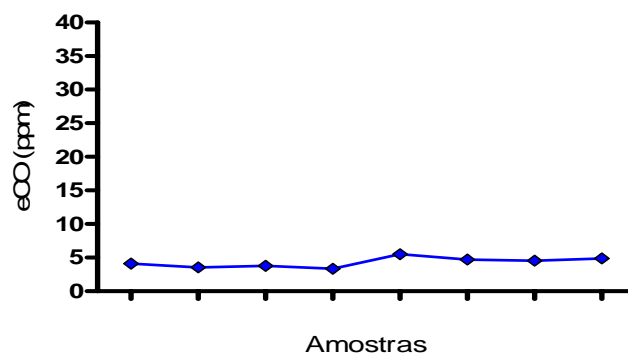


Figura 23 – Evolução dos níveis de CO expirado do Animal 2 do Grupo Controle, ao longo do tempo.

A figura 24 indica a variação das concentrações dos níveis de eCO, ao longo do experimento, dos grupos Automático e Manual do trabalho de (PINO *et al.*,2004), conforme descrito anteriormente.

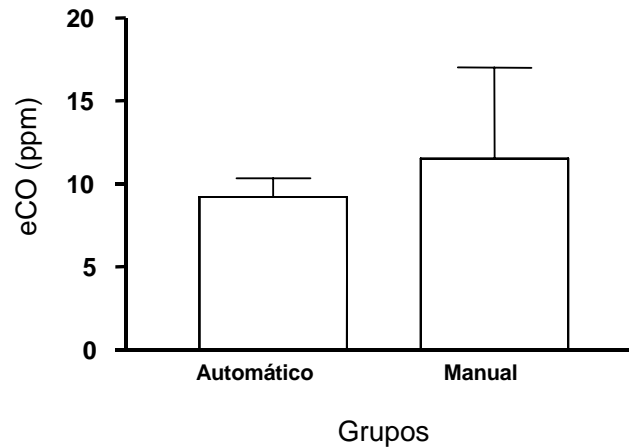


Figura 24 – Níveis de eCO entre os grupos Automático e Manual. Os valores são apresentados como médias e erro padrão.

Ao se comparar os níveis do eCO entre os grupos Automático e Manual, não houve diferença significativa entre estes dois grupos, com um valor de $p = 0,64$. Os grupos foram então reunidos num único grupo “SDRA”, conforme descrito anteriormente.

Entre os grupos SDRA e Controle foi encontrada uma diferença significativa quanto aos níveis de eCO, ao longo de todo o experimento, com um valor de $p=0,03$ (Figura 25).

A concentração basal média dos animais do grupo Controle e das amostras anteriores à injúria pulmonar do grupo SDRA foi de $5,10 \pm 2,58$ ppm. Já a concentração final, após a injúria pulmonar, no grupo SDRA, ficou em $18,65 \pm 6,21$ ppm.

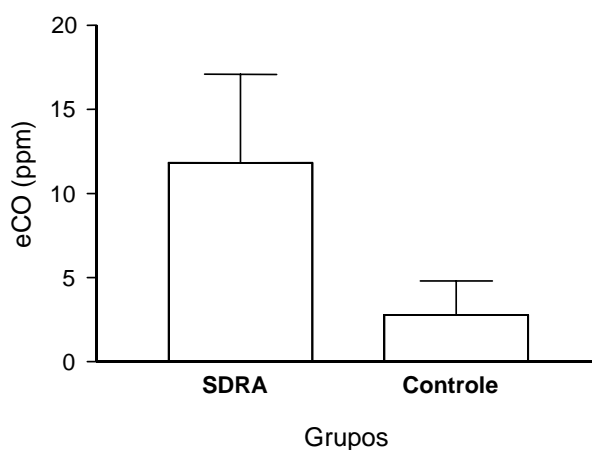


Figura 25 – Níveis de eCO entre os grupos SDRA e Controle. Os valores são apresentados como médias e erro padrão.

A figura 26 apresenta a variação da concentração dos níveis de eCO entre as primeiras amostras, as amostras imediatamente anteriores à injúria pulmonar e as últimas amostras dos experimentos, dos animais do grupo SDRA.

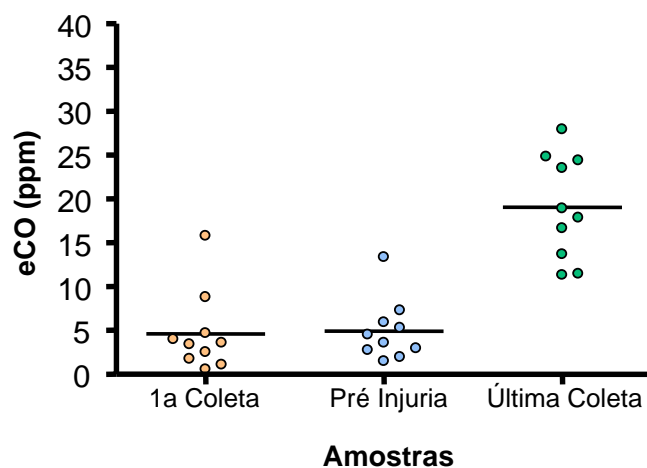


Figura 26 – Variação do eCO na primeira coleta, na coleta anterior à injúria pulmonar e na última coleta pós injúria, dos animais do Grupo SDRA. O valor médio de cada momento é apresentado.

Ao se comparar os níveis do eCO da primeira coleta com a coleta imediatamente anterior à lesão pulmonar, não houve diferença significativa entre estes dois grupos, com um valor de $p = 0,55$ (Figura 27)

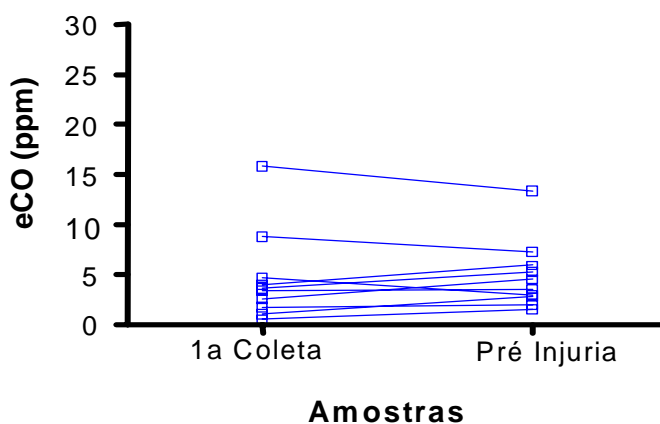


Figura 27 – Variação do eCO entre a primeira coleta e a imediatamente anterior à injúria pulmonar, dos animais do Grupo SDRA.

Houve um aumento significativo do CO expirado ($p < 0,01$), no grupo SDRA, ao comparar os níveis do eCO na pré-injúria pulmonar com a última coleta amostral do experimento, com instauração de SDRA (Figura 28).

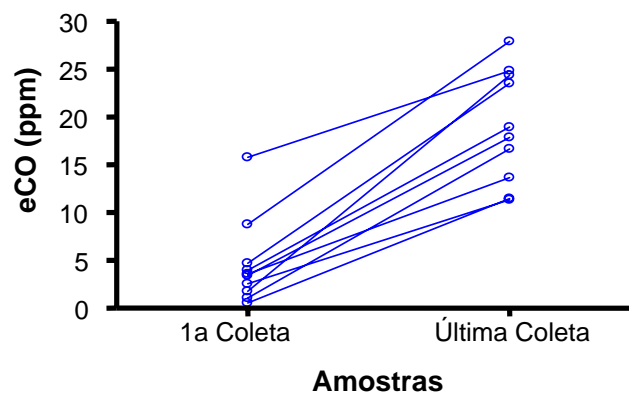


Figura 28 – Evolução do eCO dos animais, no momento anterior à injúria pulmonar (T0) e na última coleta pós injúria (T5), no grupo SDRA

No grupo controle, o valor médio do eCO, ao final do experimento, ficou em 2,85 ppm ($\pm 1,56$ ppm). Apesar da pequena quantidade de experimentos, não houve diferenças significativas ($p = 0,36$) ao se comparar o eCO da primeira e da última amostragem no grupo controle.

Os níveis de eCO, entre os grupos SDRA e controle, também apresentaram uma diferença significativa, com um valor $p < 0,02$ (Figura 29).

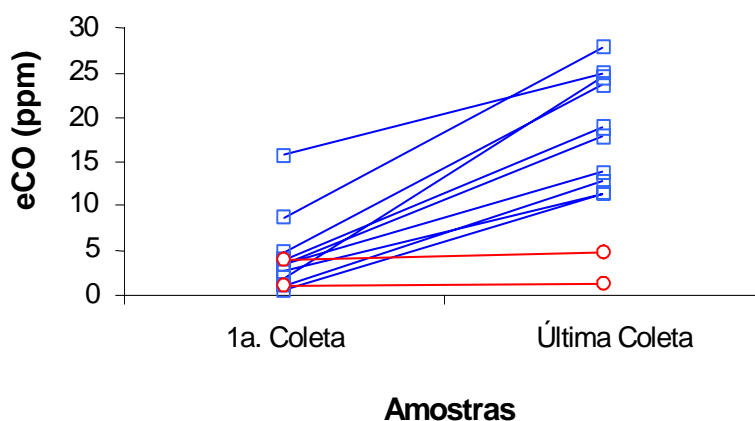


Figura 29 – Evolução do eCO entre as amostras da primeira coleta dos experimentos e as da última coleta, dos animais no grupo SDR (□) e controle (○)

Nos três animais do grupo SDR em que se realizou o LBA, o total de Neutrófilos apresentou um coeficiente de correlação (r) com o CO expirado de 0,71 ($p=0,002$). A dispersão entre estes níveis e a evolução de cada animal podem ser observadas (Figuras 30 e 31).

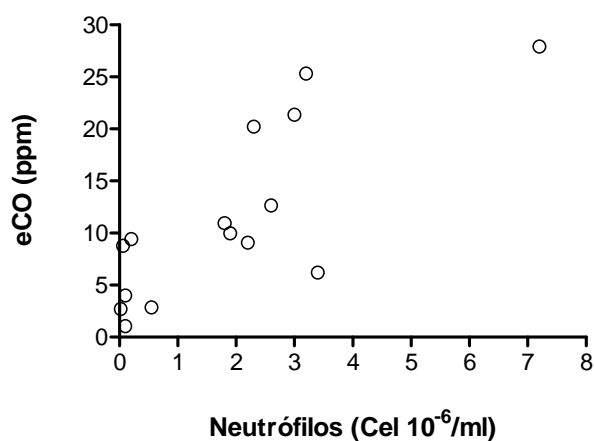


Figura 30 – Dispersão entre os níveis do eCO e de Neutrófilos do BAL em três animais do grupo SDR.

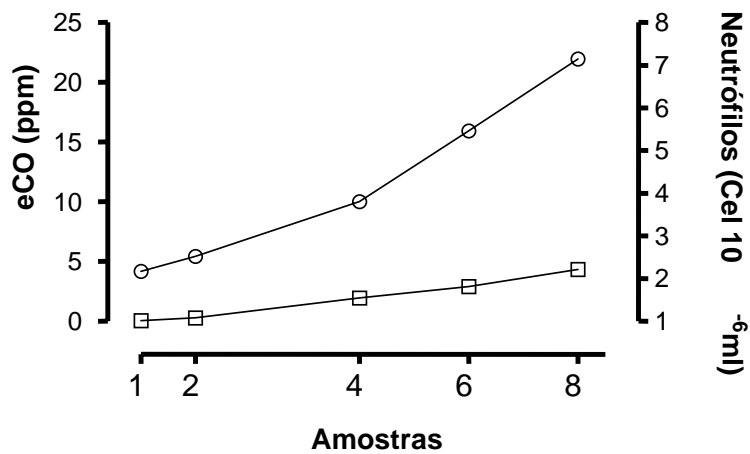


Figura 31 – Evolução, ao longo do tempo, dos níveis do eCO (○) e de Neutrófilos (□) do LBA em três animais do grupo SDRA. O valor médio de cada momento é apresentado.

A Figura 32 apresenta a correlação entre os níveis do eCO e da elastância pulmonar nos animais do grupo SDRA. Apesar da distribuição da nuvem amostral, a correlação entre a elastância pulmonar e o eCO apresentou um r de 0,19 e $p = 0,09$.

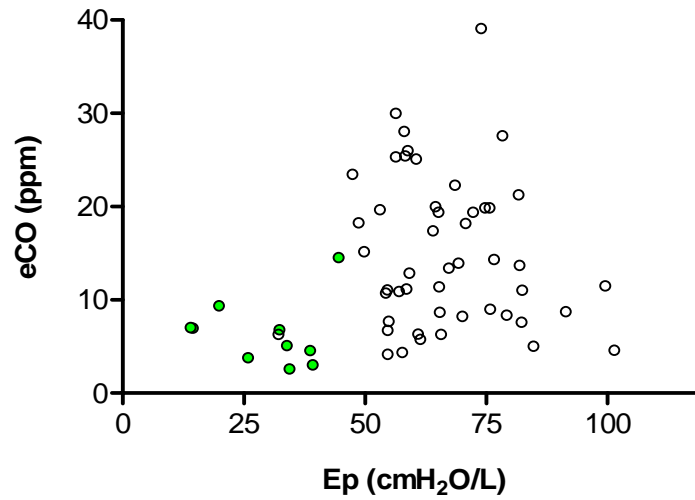


Figura 32 – Dispersão entre os níveis do eCO e da Ep nos animais do grupo SDR. Estão distinguidos as amostras dos momentos anteriores (●) e posteriores (○) à injúria pulmonar.

Quando analisados os dados da gasometria, não houve relação entre os níveis de PaO₂ e eCO dos momentos da análise gasométrica, $r= 0,12$ e $p < 0,51$, conforme indica a figura 33

Da mesma forma, não houve evidências da relação entre o PaCO₂ e os níveis de eCO, $r= 0,21$ e $p < 0,28$ (Figura 34).

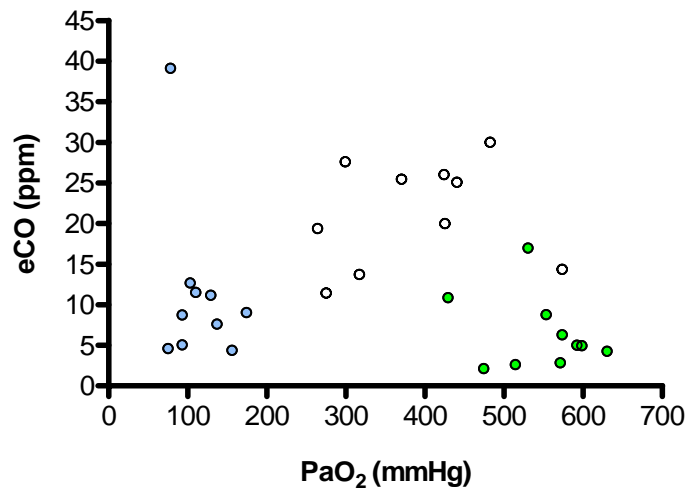


Figura 33 – Dispersão entre os níveis do eCO e da PaO₂, nos animais do grupo SDRA. Estão distinguidos as amostras dos momentos anteriores à injúria pulmonar (●), logo após à injúria pulmonar (●) e da última amostra após a injúria pulmonar (○).

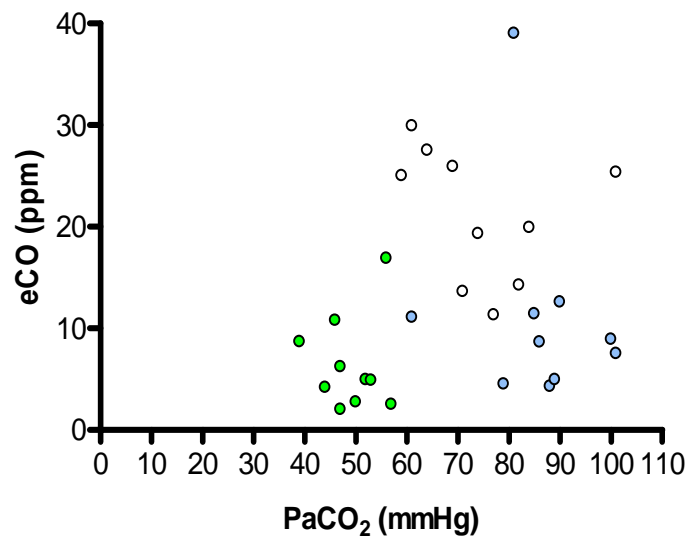


Figura 34 – Dispersão entre os níveis do eCO e da PaCO₂, nos animais do grupo SDRA. Estão distinguidos as amostras dos momentos anteriores à injúria pulmonar (●), logo após à injúria pulmonar (●) e da última amostra após a injúria pulmonar (○).

5 - Discussão

O valor basal de CO expirado dos animais exposto neste trabalho ($5,10 \pm 2,58$ ppm) mostrou-se elevado em relação aos trabalhos realizados em humanos saudáveis, não fumantes, com respiração espontânea, como indicado na Tabela 6. Entretanto não há estudos sobre os níveis do eCO em suínos em respiração espontânea ou mesmo em ventilação mecânica, de forma que, a princípio, não se pode comparar os resultados entre espécies distintas. Mais estudos são necessários para determinar a origem desta diferença.

Apenas o trabalho de ZEGDI *et al.* (2000) foi realizado em indivíduos mecanicamente ventilados, e este encontrou um valor basal de $0,63 \pm 0,13$ ppm. A forma de coleta e a não correção dos níveis de eCO pela contaminação do espaço morto, podem ter sido a causa de um valor basal baixo de ZEGDI *et al.* (2000) em comparação aos estudos em respiração espontânea de humanos. O presente trabalho apresentou um método de correção do eCO amostrado, que compensa a mistura dos gases no espaço morto, encontrando um valor de eCO proximal ao CO alveolar. A taxa média de correção calculada do eCO para o CO alveolar foi de $1,60 \pm 0,39$ ppm. Neste trabalho, seguindo os achados de ZEGDI *et al.* (2000), a coleta do eCO era realizada, conforme descrito anteriormente, após pelo menos quinze minutos do início da ventilação mecânica, com $F_{I}O_2$ em 1,0, pois este seria o tempo necessário para a estabilização do eCO após um aumento súbito em seus níveis.

Tabela 6: Valor basal do eCO em diversos estudos.

ESTUDOS	eCO basal
LIMA <i>et al.</i> (2005)	5,10 (\pm 2,5) ppm
PAREDI <i>et al.</i> (1999)	3,0 (\pm 0,40) ppm
ANTUNI <i>et al.</i> (2000)	2,0 (\pm 0,15) ppm
ZAYASU <i>et al.</i> (1997)	1,5 (\pm 0,30) ppm
ZEGDI <i>et al.</i> (2000)	0,63 (\pm 0,13) ppm

Valor basal do eCO de estudos em humanos saudáveis, não fumantes, em respiração espontânea. Em negrito, os resultados do presente estudo, realizado em suínos mecanicamente ventilados.

Conforme pode ser visto na figura 27, há uma grande variância dos valores basais de todos os animais estudados. De fato, não há estudos na literatura apresentando um valor padrão para o eCO basal ou uma faixa de normalidade para o eCO, nem mesmo em indivíduos saudáveis ou de mesma faixa etária (Tabela 6). Mesmo em indivíduos com diagnósticos semelhantes não há concordância, como pode ser visto nos estudos sobre o eCO em fibrose cística de ANTUNI *et al.* (2000) e PAREDI *et al.* (1999), que encontraram níveis de eCO de 4,8 (\pm 0,3) ppm e 8,4 (\pm 1,0) ppm, respectivamente, em pacientes não tratados.

Como o valor do eCO basal parece apresentar uma grande variância, pode ser necessário distinguir, primeiramente, um valor de referência para o indivíduo a ser estudado. A partir deste valor inicial pode-se monitorizar a progressão da injúria pulmonar através da evolução da curva dos níveis do eCO, dado que houve significância estatística, conforme demonstrado, entre os níveis de eCO anteriores e posteriores à lesão pulmonar (Figura 28).

O valor do eCO encontrado nos grupos Automático e Manual, do trabalho de PINO *et al.* (2004), mostrou que a forma de ventilação parece não causar influência nos níveis de

eCO, o que é razoável, já que foram utilizados protocolos protetores nos dois casos. Segundo ZEGDI *et al.* (2000), não havendo alterações nos parâmetros da $F_{I}O_2$, os níveis de eCO permaneceriam constantes por até 8 horas de ventilação mecânica. Como o tempo de experimento deste estudo ficou abaixo deste valor, em cerca de 6 horas, podemos considerar o eCO amostrado constante durante todo o experimento.

Como não houve diferenças significativas na comparação dos níveis de eCO das coletas anteriores à lesão pulmonar, pode-se considerar que o aumento nos níveis de eCO deu-se exclusivamente pela injúria pulmonar. Outro fator que aponta para esta hipótese é que os níveis de eCO do grupo Controle, onde não houve injúria pulmonar, não apresentaram diferenças significativas ao longo de todo o tempo de experimento.

Apesar do grupo controle ter empregado apenas dois animais, a diferença entre os valores de eCO finais observados entre os grupos SDRA e Controle ($p < 0,002$) permite considerar que o aumento nos níveis de eCO parece ter sido caracterizado apenas pela injúria pulmonar, conforme indicado na figura 29.

A correlação apresentada entre os níveis de Neutrófilos do LBA e o eCO, conforme pode ser visto nas figuras 30 e 31, pode ser um achado importante, visto que, apesar do LBA fornecer e quantificar marcadores celulares específicos, este é um exame invasivo e requer um especialista médico para realizar as coletas e a análise dos dados. O eCO, por outro lado, é uma medida não invasiva, com coleta simplificada e eficaz.

Mesmo sendo uma técnica de referência, a análise do eCO pela cromatografia gasosa, como a realizada neste trabalho, requer equipamentos específicos, de difícil disponibilidade e alto custo, conforme citado por KHARITONOV *et al.*, (2001b). Existem analisadores portáteis comerciais de CO, mais simples e de baixo custo, que utilizam células químicas em sua análise, e que servem, primariamente, para se indicar o hábito de fumar. Estes equipamentos têm a capacidade de detectar baixas concentrações de CO, com resolução e sensibilidade de 1 ppm. Nestes equipamentos, a análise do eCO geralmente é realizada ativamente, expirando-se através de um bocal conectado ao analisador, e o resultado da análise gasosa é indicado em tempo real.

Apesar de não serem úteis na monitorização da injúria pulmonar em indivíduos mecanicamente ventilados, pois não possuem adaptadores para uma coleta passiva, como o

eCO basal, como a variação dos níveis de eCO na injúria pulmonar relatados neste estudo ultrapassam a sensibilidade destes equipamentos, parece ser justificável a utilização destes analisadores portáteis na monitorização do eCO durante a inflamação pulmonar.

A comparação dos níveis médios de eCO e de neutrófilos em cada coleta (Figura 31) indica haver um acompanhamento na elevação dos níveis do eCO em relação aos neutrófilos do LBA, isto é, os níveis de eCO seguem a tendência dos níveis de neutrófilos, ao longo do tempo de inflamação.

Como os neutrófilos são os melhores indicativos de fenômenos agudos da inflamação pulmonar, se o objetivo é o de acompanhar a evolução da injúria pulmonar, o eCO apresenta vantagens em relação ao LBA, revelando não ser nocivo ao paciente. Na coleta do eCO, ao contrario do LBA, não é preciso desconectar o paciente do suporte ventilatório, o que causa, mesmo que momentaneamente, apnéia, suspensão da terapia de O₂ e perda da PEEP. Este desarranjo pode acarretar na diminuição da PaO₂, do pH, aumento da PCO₂ e até mesmo provocar atelectasias, podendo exigir re-expansão pulmonar, realizada com altas pressões intrapulmonares. Então, as vantagens do eCO sobre o LBA são sua coleta e análise simplificada e, principalmente, a preservação da integridade da via aérea do paciente.

A forma de coleta passiva do eCO, através do dispositivo de coleta utilizado neste trabalho, demonstrou ser estável e reprodutível. Este tipo de obtenção de amostras possui vantagens sobre a forma ativa, presente nos estudos de PAREDI *et al.* (2003) e OHRUI *et al.* (2001), pois evita quaisquer influências ao eCO decorrentes de variações na vazão expiratória, tempo de retenção da inspiração e, mesmo, independe da compreensão e colaboração do paciente quanto à manobra a ser realizada.

A falta de relação entre os níveis de eCO e os resultados gasométricos sugere que o eCO não deve ser identificado como um marcador da hipóxia ou da hipercarpnia. No caso da PaO₂, seu rápido crescimento decorrente do recrutamento pós-injúria não foi acompanhada de uma resposta do eCO à melhora da relação ventilação-perfusão.

A figura 30 indica uma acentuada dispersão entre o eCO e a elastância pulmonar. Esta dispersão parece elevar-se ainda mais com o aumento da elastância. Pode ser correto afirmar que, apesar de serem conseqüências de um mesmo evento inflamatório, estas

variáveis possuem uma resposta independente, ou mesmo um tempo de reação diferente à instauração da injúria pulmonar. Mais estudos são necessários para comprovar estas afirmações.

Outro dado que pode ter influenciado o tempo de resposta inflamatória e as diferenças apresentadas entre o eCO e a elastância pulmonar e, mesmo em relação ao LBA, é que o modelo de SDRA induzida por ácido oléico, resulta num modelo inflamatório muito agudo, com tempo de instauração da injúria pulmonar em torno de 30 minutos. Estas respostas agudas, aliadas ao tempo de experimento reduzido após a injúria pulmonar, de cerca de 6 horas, podem ter mascarado as respostas pulmonares mais tardias, ou mesmo a estabilização destes marcadores agudos num cenário crônico mais fisiológico, com uma instauração mais lenta da injúria pulmonar e maior tempo de recuperação.

6 – Conclusão

O presente estudo mostrou que o eCO pode ser mensurado em animais ventilados mecanicamente, e que após uma inflamação pulmonar, como a provocada pela SDRA induzida, estes níveis de eCO se mostram aumentados e relacionados com a celularidade.

A técnica de coleta passiva do eCO mostrou-se estável, e os resultados encontrados indicam que o sistema não permite a contaminação do eCO amostrado, sendo útil para experimentos de monitorização de gases expirados em pacientes ventilados mecanicamente.

Com os resultados apresentados, admite-se a utilidade da mensuração do eCO e sua relação com os níveis inflamatórios pulmonares, onde se propõe mais estudos para assegurar ser este um método não invasivo confiável de monitorização pulmonar na SDRA, principalmente na monitorização de longa duração, com uma instauração mais lenta da inflamação pulmonar.

7 - Anexo I

Algoritmo em linguagem Matlab para calcular um valor de eCO mais próximo dos níveis de eCO alveolar, que utiliza os parâmetros gerados pelo o programa MECANICA, conforme descrito anteriormente.. Ver o texto para mais detalhes.

```
i=5; % começo um pouco adiante, para igualar o momento da coleta %
j=1;
fs=Configuracao.FrequenciaAmostragem;
deltat=1/fs;
while i < (length(Trechos)-10) % o num. de ciclos que terminei a coleta %
%
% separa os trechos expiratórios do CO2, Fluxo e Vol. %
co2ex{j}=Sinal.Dado((Trechos(i):Trechos(i+1)),4);

fluxoex{j}=Sinal.Dado(Trechos(i):Trechos(i+1),3);
volumeex{j}=Sinal.Dado(Trechos(i):Trechos(i+1),13);
% Gera um grupo de vetores p/ cada ciclo/sinal %
i=i+2;
j=j+1;
end
i=1;
while i< length(fluxoex)
% separa cada ciclo %
fco2=(co2ex{i});
fluxon=-(fluxoex{i});% c/ TOT 6.5 %;
vte=(volumeex{i}); % c/ TOT 6.5 %;
% multiplica fluxo e fco2 de cada ciclo %
mult=(fluxon.*fco2);
% integra %
intcima=cumtrapz(mult)*deltat;
intfluxo=cumtrapz(fluxon)*deltat;
% calcula fco2 medio de cada ciclo %
fco2med(i)=intcima(end)/intfluxo(end);
% separa o vol. exp. e desconta o Vd do sistema (cada ciclo) %
vd=0.123;
vtem(i)= (max(vte)-vd);
i=i+1;
end
% multiplica o fco2 de cada ciclo pelo respectivo volume. %
x=(fco2med.*vtem);
% Normaliza, dividindo o Sum da multiplicação pelo Sum do volume. %
mediaglobal=((sum(x)/sum(vtem))*100)
%-----
% Retirada do VD do Y e cálculo do FCO2 do tubo
%-----
vy=0.030;
vtey=vtem-vy; % descontando o VD do Y %
% Normaliza e multiplico pelo FCO2 médio global %
fco2tubo=(sum(vtey)/sum(vtem))*mediaglobal
hold off;
```

8 – Referências Bibliográficas

ALVING, K., WEITZBERG, E., LUNDBERG, J. M., 1993, "Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics", *Eur. Respir. J.*, 6, 9: pp. 1368-1370.

ANÔNIMO, 1967, *Nobel Lectures In Physics 1901 - 1921*, Nobel Lecture, pp. 99-155.

ANÔNIMO, 1987, *MANUAL MERCK DE MEDICINA*. 15^a ed., São Paulo, Ed. Roca.

ANÔNIMO, 2000a, *CHROMPACK APPLICATION NOTE - Isothermal analysis of CO and CO2 in air*, Varian Analytical Instruments, A00494 - GC, pp. 1-2.

ANÔNIMO, 2000b, *Gas Sampling Bags*, Alltech Associates Inc, Data Sheet 4150D, p. 2.

ANÔNIMO, 2001, *Sample Bags 232 Series*, SKC Inc., Form 3781 - Rev 0411, pp. 1-4.

ANTCZAK, A., GORSKI, P., 2002, "Markers of pulmonary diseases in exhaled breath condensate", *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 15, 4: pp. 317-323.

ANTUNI, J. D., KHARITONOV, S. A., HUGHES, D., HODSON, M. E., BARNES, P. J., 2000, "Increase in exhaled carbon monoxide during exacerbations of cystic fibrosis", *Thorax*, 55, 2: pp. 138-142.

ASANO, K., CHEE, C. B., GASTON, B., LILLY, C. M., GERARD, C., DRAZEN, J. M., STAMLER, J. S., 1994, "Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 21: pp. 10089-10093.

BALINT, B., DONNELLY, L. E., HANAZAWA, T., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 2001, "Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke", *Thorax*, 56, 6: pp. 456-461.

BAYDUR, A., CHA, E. J., SASSOON, C. S., 1987, "Validation of esophageal balloon technique at different lung volumes and postures", *J. Appl. Physiol.*, 62, 1: pp. 315-321.

BECHER, G., WINSEL, K., BECK, E., NEUBAUER, G., SUN, F., STRESEMANN, E., 1997, "Breath Condensate as a method of noninvasive assessment of inflammation mediators from the lower airways.", *Pneumologie*, 51, pp. 456-459.

BORLAND, C., COX, Y., HIGENBOTTAM, T., 1993, "Measurement of exhaled nitric oxide in man", *Thorax*, 48, 11: pp. 1160-1162.

BYRNES, C. A., DINAREVIC, S., BUSST, C. A., SHINEBOURNE, E. A., BUSH, A., 1997, "Effect of measurement conditions on measured levels of peak exhaled nitric oxide", *Thorax*, 52, 8: pp. 697-701.

CARPENTER, C. T., PRICE, P. V., CHRISTMAN, B. W., 1998, "Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS", *Chest*, 114, 6: pp. 1653-1659.

CHAPMAN, J. T., CHOI, A. M., 2001, "Exhaled monoxides as a pulmonary function test: use of exhaled nitric oxide and carbon monoxide", *Clin. Chest Med.*, 22, 4: pp. 817-836.

CORRADI, M., MAJORI, M., CACCIANI, G. C., CONSIGLI, G. F., DE'MUNARI, E., PESCI, A., 1999, "Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease", *Thorax*, 54, 7: pp. 572-575.

CORRADI, M., MONTUSCHI, P., DONNELLY, L. E., PESCI, A., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 2001, "Increased nitrosothiols in exhaled breath

condensate in inflammatory airway diseases", *Am. J. Respir Crit. Care Med.*, 163, 4: pp. 854-858.

CORRADI, M., PELIZZONI, A., MAJORI, M., CUOMO, A., DE', M. E., PESCI, A., 1998, "Influence of atmospheric nitric oxide concentration on the measurement of nitric oxide in exhaled air", *Thorax*, 53, 8: pp. 673-676.

DE BENEDETTO, F., ACETO, A., DRAGANI, B., SPACONE, A., FORMISANO, S., COCCO, R., SANGUINETTI, C. M., 2000, "Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients", *Monaldi Arch. Chest Dis.*, 55, 3: pp. 185-188.

DUARTE M.F., 2001, "Espectrometria de Massa de Electrospray- Técnica do Presente e do Futuro", *Química*, 80, pp. 36-42.

DUCKWORTH, L.J., KISSOON, N. & SULLIVAN, K.J., 1999, "Nitric Oxide Breath Analysis: A Method For Monitoring Inflammation In Asthma", *Jacksonville Medicine*, 11, pp. 485-487.

EFFROS, R. M., HOAGLAND, K. W., BOSBOUS, M., CASTILLO, D., FOSS, B., DUNNING, M., GARE, M., LIN, W., SUN, F., 2002, "Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 165, 5: pp. 663-669.

EICEMAN, G. A., 2000, "Instrumentation of Gas Chromatography". In: R.A.Meyers (ed), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, USA. John Wiley & Sons Ltd.

EICEMAN, G. A., GARDEA-TORRESDEY, J., OVERTON, E., CARNEY, K., DORMAN, F., 2002, "Gas chromatography", *Anal. Chem.*, 74, 12: pp. 2771-2780.

FAIRCHILD, C. I., STAMPFER, J. F., 1987, "Particle concentration in exhaled breath", *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 48, 11: pp. 948-949.

GESSNER, C., KUHN, H., SEYFARTH, H. J., PANKAU, H., WINKLER, J., SCHAUER, J., WIRTZ, H., 2001, "Factors influencing breath condensate volume", *Pneumologie*, 55, 9: pp. 414-419.

GISBERT, J. P., PAJARES, J. M., 2004, "Review article: C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection - a critical review", *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 20, 10: pp. 1001-1017.

GOMEZ, F. P., MARTINEZ, P. G., BARBERA, J. A., ROCA, J., RODRIGUEZ-ROISIN, R., 1998, "Measurement of exhaled nitric oxide in healthy subjects", *Med. Clin.*, 111, 1: pp. 1-5.

GUATURA, S. B., MARTINEZ, J. A., SANTOS BUENO, P. C., SANTOS, M. L., 2000, "Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption", *Sao Paulo Med. J.*, 118, 4: pp. 93-98.

GUSTAFSSON, L. E., 1998, "Exhaled nitric oxide as a marker in asthma", *Eur. Respir. J. Suppl.*, 26, pp. 49S-52S.

HABIB, M. P., CLEMENTS, N. C., GAREWAL, H. S., 1995, "Cigarette smoking and ethane exhalation in humans", *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, 151, 5: pp. 1368-1372.

HALE, A., JASKOWIAK, A., MANTZ, K., THOTTAKARA, L. 2003, *Exhaled Breath Condensate System for Use During Exercise*. Biomedical Engineering, 301, pp. 1-20.

HANAZAWA, T., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 2000, "Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162, 4 Pt 1: pp. 1273-1276.

HO, L. P., INNES, J. A., GREENING, A. P., 1998, "Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide", *Thorax*, 53, 8: pp. 680-684.

HORVATH, I., DONNELLY, L. E., KISS, A., PAREDI, P., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 1998, "Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress", *Thorax*, 53, 8: pp. 668-672.

JARVIS, M. J., BELCHER, M., VESEY, C., HUTCHISON, D. C., 1986, "Low cost carbon monoxide monitors in smoking assessment", *Thorax*, 41, 11: pp. 886-887.

KAZUI, M., ANDREONI, K. A., NORRIS, E. J., KLEIN, A. S., BURDICK, J. F., BEATTIE, C., SEHNERT, S. S., BELL, W. R., BULKLEY, G. B., RISBY, T. H., 1992, "Breath ethane: a specific indicator of free-radical-mediated lipid peroxidation following reperfusion of the ischemic liver", *Free Radic. Biol. Med.*, 13, 5: pp. 509-515.

KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 2001a, "Exhaled markers of inflammation", *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 1, 3: pp. 217-224.

KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 2001b, "Exhaled markers of pulmonary disease", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163, 7: pp. 1693-1722.

KHARITONOV, S. A., CHUNG, K. F., EVANS, D., O'CONNOR, B. J., BARNES, P. J., 1996, "Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153, 6 Pt 1: pp. 1773-1780.

KHARITONOV, S.A. & BARNES, P.J., 2001, "Exhaled markers of inflammation", *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, v. 1, n. 3 pp. 217-224.

KIMBERLY, B., NEJADNIK, B., GIRAUD, G. D., HOLDEN, W. E., 1996, "Nasal contribution to exhaled nitric oxide at rest and during breathholding in humans", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153, 2: pp. 829-836.

KOSTIKAS, K., PAPTAEODOROU, G., GANAS, K., PSATHAKIS, K., PANAGOUE, P., LOUKIDES, S., 2002, "pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 165, 10: pp. 1364-1370.

LARSTAD, M., LOH, C., LJUNGKVIST, G., OLIN, A. C., TOREN, K., 2002, "Determination of ethane, pentane and isoprene in exhaled air using a multi-bed adsorbent and end-cut gas-solid chromatography", *Analyst.*, 127, 11: pp. 1440-1445.

LEONE, A. M., GUSTAFSSON, L. E., FRANCIS, P. L., PERSSON, M. G., WIKLUND, N. P., MONCADA, S., 1994, "Nitric oxide is present in exhaled breath in humans: direct GC-MS confirmation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, 2: pp. 883-887.

LOUKIDES, S., BOUROS, D., PAPTAEODOROU, G., PANAGOU, P., SIAFAKAS, N. M., 2002, "The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity", *Chest*, 121, 2: pp. 338-346.

LUONG, J., 2002, *APPLICATION NOTE - Fast separation of oxygen, nitrogen and carbon monoxide*. Varian Analytical Instruments , A2063 - GC, pp. 1-2.

MALFERTHEINER, P., MEGRAUD, F., O'MORAIN, C., HUNGIN, A. P., JONES, R., AXON, A., GRAHAM, D. Y., TYTGAT, G., 2002, "Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection - The Maastricht 2 - 2000 Consensus Report", *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16, 2: pp. 167-180.

MASSARO, A. F., GASTON, B., KITA, D., FANTA, C., STAMLER, J. S., DRAZEN, J. M., 1995, "Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152, 2: pp. 800-803.

MASSARO, A. F., MEHTA, S., LILLY, C. M., KOBZIK, L., REILLY, J. J., DRAZEN, J. M., 1996, "Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153, 5: pp. 1510-1514.

MCNAIR H.N., BONELLI E.J., 1969, *Basic Gas Chromatography*, 5 ed, Berkeley, USA. Varian Aerograph, pp. 3-121

MCNAUGHT A.D., WILKINSON A., 1997, "IUPAC Compendium of Chemical Terminology - The Gold Book", *Blackwell Science*, 2, pp. 65-66.

MONTUSCHI, P., BARNES, P. J., 2002, "Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation", *Trends Pharmacol. Sci.*, 23, 5: pp. 232-237.

MONTUSCHI, P., CORRADI, M., CIABATTONI, G., NIGHTINGALE, J., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 1999, "Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160, 1: pp. 216-220.

MONTUSCHI, P., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 2001, "Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD", *Chest*, 120, 2: pp. 496-501.

MUTLU, G. M., GAREY, K. W., ROBBINS, R. A., DANZIGER, L. H., RUBINSTEIN, I., 2001, "Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 164, 5: pp. 731-737.

NORWOOD, D. M., WAINMAN, T., LIOY, P. J., WALDMAN, J. M., 1992, "Breath ammonia depletion and its relevance to acidic aerosol exposure studies", *Arch. Environ. Health*, 47, 4: pp. 309-313.

NOWAK, D., ANTCZAK, A., KROL, M., PIETRAS, T., SHARIATI, B., BIALASIEWICZ, P., JECZKOWSKI, K., KULA, P., 1996, "Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers", *Eur. Respir. J.*, 9, 4: pp. 652-657.

NOWAK, D., KASIELSKI, M., PIETRAS, T., BIALASIEWICZ, P., ANTCZAK, A., 1998, "Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD", *Monaldi Arch. Chest Dis.*, 53, 3: pp. 268-273.

OHRUI, T., YAMAYA, M., YAMADA, N., OKINAGA, S., YANAI, M., SASAKI, H., 2001, "Detection of exhaled CO as a simple non-invasive tool for monitoring acute exacerbations of asthma in the elderly", *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 38, 4: pp. 484-486.

OLIVEIRA, O. C., ALVES B.J., 1998, *Cromatógrafo Perkin-Elmer GC Modelo 1022: Instruções básicas de uso em análise de redução de acetileno (ARA)*. Embrapa-CNPAB. Documentos, 82, pp. 4-5.

PAREDI, P., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 2003, "Exhaled carbon monoxide in lung disease", *Eur. Respir. J.*, 21, 1: pp. 197-198.

PAREDI, P., SHAH, P. L., MONTUSCHI, P., SULLIVAN, P., HODSON, M. E., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J., 1999, "Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with cystic fibrosis", *Thorax*, 54, 10: pp. 917-920.

PAREDI, P., KHARITONOV, S.A. & BARNES, P.J., 2000, "Elevation of exhaled ethane concentration in asthma", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 162, n. 4 Pt 1 pp. 1450-1454.

PAULING, L., ROBINSON, A.B., TERANISHI, R. & CARY, P., 1971, "Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 68, n. 10 pp. 2374-2376.

PHILLIPS, M., 1992, "Breath Tests in Medicine". *Sci. Am.*, 267, 1: pp. 74-79.

PHILLIPS, M., 1997, "Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath", *Anal.Biochem.*, v. 247, n. 2 pp. 272-278.

PINO, A. V., 2004, *Ventilação Automática Protetora Na Lesão Pulmonar Aguda*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

POLITZER, A. R., 2004, *An Examination of the Relationship between Environmental Science and Law due to Emerging Micro-scale Gas Chromatography Technolog*. M. Sc. dissertation, Louisiana State University, Louisiana, U.S.A.

ROVARIL A., LEVANTEZI F., MIRANDA J., JUNQUEIRA P., 2000, *Análise Instrumental - Cromatografia Gasosa*. 3 ed., Campinas, ETECAP.

RUTGERS, S. R., VAN DER MARK, T. W., COERS, W., MOSHAGE, H., TIMENS, W., KAUFFMAN, H. F., KOETER, G. H., POSTMA, D. S., 1999, "Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease", *Thorax*, 54, 7: pp. 576-580.

SANCHEZ, G. C., ROMERO, R. B., JIMENEZ, S. R., CASTILLO, G. J., 2001, "Reproducibility of the technique for measuring nitric oxide in exhaled air in healthy subjects", *Arch. Bronconeumol.*, 37, 9: pp. 371-374.

SATO, K., SAKAMAKI, T., SUMINO, H., SAKAMOTO, H., HOSHINO, J., MASUDA, H., SAWADA, Y., MOCHIDA, M., OHYAMA, Y., KURASHINA, T., NAKAMURA, T., ONO, Z., 1996, "Rate of nitric oxide release in the lung and factors influencing the concentration of exhaled nitric oxide", *Am. J. Physiol.*, 270, 6 Pt 1: pp. L914-L920.

SCHILLING, J., HOLZER, P., GUGGENBACH, M., GYURECH, D., MARATHIA, K., GEROULANOS, S., 1994, "Reduced endogenous nitric oxide in the exhaled air of smokers and hypertensives", *Eur. Respir. J.*, 7, 3: pp. 467-471.

SHINKAI, M., SUZUKI, S., MIYASHITA, A., KOBAYASHI, H., OKUBO, T., ISHIGATSUBO, Y., 2002, "Analysis of exhaled nitric oxide by the helium bolus method", *Chest*, 121, 6: pp. 1847-1852.

SILKOFF, P.E., 1999, "Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide in Adults and Children-1999", *Am. J. Respir. Crit. Care Méd.*, v. 160, n. pp. 2104-2117.

SPELLER C.V., BORGES N.J., 2001, *Teoria do Plasma e Espectrometria de Massa*. Atualização em Engenharia de Materias, UFSC, pp. 12-19.

VAN BEURDEN, W. J., HARFF, G. A., DEKHUIJZEN, P. N., VAN DEN BOSCH, M. J., CREEMERS, J. P., SMEENK, F. W., 2002, "An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate", *Respir Med*, 96, 3: pp. 197-203.

VEGA-BUSTILHOS O., SASSINE A., MARCH R., 2001, *A Espectrometria de Massa Quadrupolar*. 1 ed., São Paulo, Ed. Scortecci.

VON MUHLEN C., LANÇAS F.M., 2004, "Unified Chromatography.", *Quim. Nova*, 27, 5: pp. 747-753.

WAGENER, F. A., VOLK, H. D., WILLIS, D., ABRAHAM, N. G., SOARES, M. P., ADEMA, G. J., FIGDOR, C. G., 2003, "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation", *Pharmacol. Rev.*, 55, 3: pp. 551-571.

YAMAYA, M., SEKIZAWA, K., ISHIZUKA, S., MONMA, M., MIZUTA, K., SASAKI, H., 1998, "Increased carbon monoxide in exhaled air of subjects with upper respiratory tract infections", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 158, 1: pp. 311-314.

ZAPPACOSTA, B., PERSICHILLI, S., MORMILE, F., MINUCCI, A., RUSSO, A., GIARDINA, B., DE SOLE, P., 2001, "A fast chemiluminescent method for H₂O₂ measurement in exhaled breath condensate", *Clin. Chim. Acta*, 310, 2: pp. 187-191.

ZARLING, E. J., CLAPPER, M., 1987, "Technique for gas-chromatographic measurement of volatile alkanes from single-breath samples", *Clin. Chem.*, 33, 1: pp. 140-141.

ZAYASU, K., SEKIZAWA, K., OKINAGA, S., YAMAYA, M., OHRUI, T., SASAKI, H., 1997, "Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156, 4 Pt 1: pp. 1140-1143.

ZEGDI, R., CAID, R., VAN DE, L. A., PERRIN, D., BURDIN, M., BOITEAU, R., TENAILLON, A., 2000, "Exhaled carbon monoxide in mechanically ventilated critically ill patients: influence of inspired oxygen fraction", *Intensive Care Med.*, 26, 9: pp. 1228-1231.

ZEGDI, R., GUILLMAIN, R., AMREIN, C., CHEVALIER, P., LAJOS, P., COUETIL, J. P., CARPENTIER, A., FABIANI, J. N., 1999, "Single breath exhaled nitric oxide in lung transplant patients: a preliminary clinical study", *Transpl. Int.*, 12, 5: pp. 346-350.