UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Toxicológicas

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA
DA CARBOXIEMOGLOBINEMIA EM
INDIVÍDUOS EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE
AO MONÓXIDO DE CARBONO

ANA CRISTINA C.G.C. MALHEIRO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. MARIA ELISA P.B. SIQUEIRA

SÃO PAULO
1991

FICHA CATALOGRÁFICA

**Elaborada pelo serviço de Biblioteca
e documentação do Conjunto das Químicas**

615.907 Malheiro, Ana Cristina C. Gabriel da Costa
M249d Determinação espectrofotométrica da carboxiemo-
globinemia em indivíduos expostos ocupacionalmente
ao monóxido de carbono / Ana C.C.G.C.Malheiro. São
Paulo, 1991.
125p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Depar-
tamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Siqueira, Maria Elisa P. Bastos

1.Carboxiemoglobinemia. 2.Monóxido de carbono.
3.Monitorização biológica. I.T. II.Siqueira,M.E.P.
B., orientador.

615.907 CDD

Este trabalho é dedicado,

*a todos que tiveram valiosa participação
na sua execução e*

*àqueles que, por ventura, venham a se
interessar pelo seu conteúdo.*

**Em especial,
à minha MÃE.**

À MARIA ELISA,

a minha admiração e gratidão.

" AS PESSOAS QUE VENCEM NESTE MUNDO
SÃO AS QUE PROCURAM
AS CIRCUNSTÂNCIAS DE QUE PRECISAM
E QUANDO NÃO AS ENCONTRAM, AS CRIAM."

(Bernard Shaw - Filósofo)

AGRADECIMENTOS

Aos *PROFESSORES DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO*, por terem-me mostrado parte do mundo da Toxicologia;

ao DR. *KOITI TSUSHIDA*, pelo incentivo e valiosas sugestões apresentadas e pelo meu constante aprendizado;

ao DR. *FELIX VAN DEURSEN*, pela breve, mas muito importante, participação na minha formação profissional;

ao PROF. DR. *GUNTER HOXTER*, pelo auxílio na análise estatística e pelo interesse que demonstrou em ensiná-la;

aos *AMIGOS* da disciplina de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo companheirismo e amizade sempre presentes;

à *MOEMA RODRIGUES DOS SANTOS*, pela normalização das referências bibliográficas;

Ao *LEONARDO VAN HALSEMA* pela inestimável colaboração e compreensão;

à *LEILA, KATIA E AURILUCE* pela ajuda, paciência e qualidade nos trabalhos de datilografia e computação;

ao *ROBSON RICCO*, pelas sugestões e auxílio na arte gráfica;

à PROF^a. *FELISMINA DA SILVA* e à *CHRISTIANNE*, pelo trabalho de revisão gramatical e ortográfica do texto;

ao *FABIO* que acompanhou e me apoiou em todas as fases da realização deste trabalho;

a todos

MUITO OBRIGADA !

RESUMO

O monóxido de carbono (CO) constitui sério risco à saúde de indivíduos expostos a este gás. Os efeitos nocivos aparecem como consequência de sua combinação com a hemoglobina formando a carboxiemoglobina (COHb). A avaliação da exposição ao CO pela monitorização biológica é realizada, preferencialmente, pela determinação da carboxiemoglobinemia. O método espectrofotométrico proposto, para a determinação de COHb, utiliza a leitura na região *Soret* (420 e 432 nm) e fatores de calibração do espectrofotômetro. É realizado estudo comparativo entre o uso do CO obtido por reação química e o de cilindro de gás na preparação de solução 100% de COHb. O método apresenta boa precisão (coeficiente de variação de 2 e 6% para 4,98 e 1,01 % de COHb, respectivamente) e sensibilidade (0,50 % de COHb) adequadas à avaliação da exposição ao monóxido de carbono. A quantificação da COHb não é comprometida pelo teor hemoglobínico nem pela opalescência (lipemia) da amostra colhida no período pós-prandial. É apresentada a carboxiemoglobinemia em fumantes (n=119) e não-fumantes (n=189) que constituem 4 grupos de indivíduos expostos ocupacionalmente ao CO (n=209) e um grupo controle (n=99); e a análise estatística dos resultados (teste não-paramétrico).

ABSTRACT

Carbon monoxide (CO) is recognized as a high risk hazard to the health of exposed workers. Combining with hemoglobin it reduces the oxygen carrying capacity of the blood. The individual overall exposure may be assessed through the carboxyhemoglobin (COHb) content of blood samples, as a biological exposure index. A spectrophotometric method is proposed using measurements in the region *Soret* (420 - 432 nm) together with calibration factors of the instrument. A comparative study is made between the use of CO from compressed gas cylinders and the CO delivered by a chemical reaction in preparing the saturated COHb solution. The method presents precision (coefficient of variation is 2 and 6% to 4,98 and 1,01% of COHb, respectively) and sensitivity (0,5% of COHb), which are adequate to the purpose. Hemoglobin and lipidic content of samples showed no effect in the COHb measurement. Carboxyhemoglobin level of four groups of exposed workers (n = 209) and a control group (n = 99) among smokers (n = 115) and non-smokers (n = 189) were determined using the method. The statistical analysis of the results are presented (non-parametric test).

ÍNDICE

pág.

1. INTRODUÇÃO	1
2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO AO MONÓXIDO DE CARBONO	3
2.1. Propriedades físicas e químicas	3
2.2. Fontes naturais e antropogênicas	4
2.3. Mecanismo de ação	8
2.4. Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação	20
2.5. Efeitos tóxicos	23
2.6. População susceptível	27
2.7. Monitorização biológica	29
2.7.1. Indicadores biológicos e seus limites	29
2.7.2. Metodologia analítica	31
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Otimização da determinação espectrofotométrica da carboxiemo- globinemia	44
4.1.1. Material	44
4.1.1.1. Amostras	44
4.1.1.2. Aparelhos e acessórios	44
4.1.1.3. Reagentes	44
4.1.2. Métodos	45
4.1.2.1. Procedimento analítico	45
4.1.2.2. Determinação dos fatores de calibração do espectro- fotômetro	47
4.1.2.3. Linearidade da técnica de quantificação	50
4.1.2.4. Precisão do método	51

4.1.2.5. Estabilidade das leituras de absorvância	52
4.1.2.6. Estabilidade da carboxiemoglobina nas amostras	52
4.1.3. Influência da matriz biológica	52
4.1.3.1. Conteúdo hemoglobínico	52
4.1.3.2. Lipemia	53
4.2. Determinação da carboxiemoglobinemia em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono	54
4.2.1. Material	54
4.2.1.1. População estudada	54
4.2.1.2. Aparelhos e acessórios	55
4.2.1.3. Reagentes	55
4.2.2. Métodos	55
5. RESULTADOS	56
5.1. Otimização da determinação espectrofotométrica da carboxiemo- globinemia	56
5.1.1. Preparação das soluções de carboxiemoglobina e de hemoglobina reduzida	56
5.1.2. Uso do monóxido de carbono obtido por reação química na preparação de solução de carboxiemoglobina	50
5.1.3. Deslocamento do monóxido de carbono dissolvido na solução	60
5.1.4. Fatores de calibração do espectrofotômetro	61
5.1.5. Linearidade da técnica de identificação	63
5.1.6. Precisão do método	65
5.1.7. Estabilidade das leituras de absorvância	67
5.1.8. Estabilidade da carboxiemoglobina nas amostras	68
5.1.9. Influência da matriz biológica	69

5.1.9.1. Conteúdo hemoglobínico	69
5.1.9.2. Lipemia	71
5.2. Carboxiemoglobinemia em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono	73
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÕES	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
 ANEXOS	
Anexo I - Equivalência entre as unidades de concentração de monóxido de carbono e as de pressão	121
Anexo II - Relações matemáticas entre a concentração atmosférica de monóxido de carbono e a carboxiemoglobinemia	122
Anexo III - Limites máximos permissíveis de monóxido de carbono no ar	124
Anexo IV - Limites biológicos de exposição	125

1. INTRODUÇÃO

A combustão da matéria carbonada é a principal fonte de energia usada pelo homem há milênios, o que lhe permitiu obter qualidade de vida adequada e alcançar grande desenvolvimento tecnológico. Entretanto, dessa queima resulta também gás de conhecida periculosidade, o monóxido de carbono (CO). Atribuem-se ao filósofo grego Aristóteles (384-322 a.C.) as primeiras observações sobre os efeitos nocivos do CO. A fumaça da queima do carvão foi usada por gregos e romanos na execução de criminosos e em suicídios (106-43 a.C.)¹²⁷.

O uso doméstico da queima do carvão, difundido no século XV, intensificou a ocorrência de intoxicações pelo CO; nas condições primitivas de cozimento dos alimentos, a ventilação insuficiente durante a combustão originava altas concentrações deste gás. Com o desenvolvimento da mineração, no século XVI, surgiu a exposição ocupacional aos *gases venenosos*, freqüentemente encontrados em minas e ricos em CO¹²⁷.

No decorrer do século XIX, o risco da exposição doméstica e industrial aumentou consideravelmente, atribuído à produção do gás de iluminação (4 a 15% de CO), do gás pobre (30 a 35% de CO) e do gás de água (35 a 45% de CO). A gravidade da exposição a altas concentrações de CO foi relatada em muitos escritos médicos. Com o advento dos veículos movidos a gás, após a 2ª Guerra Mundial, foi despertado o interesse sobre os possíveis efeitos do CO em exposições a baixos níveis^{127,136}.

O monóxido de carbono é considerado a causa mais freqüente de intoxicação tanto no meio industrial como no doméstico. Milhares de pessoas morrem, anualmente, intoxicadas e estima-se a ocorrência de número ainda maior de casos não fatais, que podem deixar seqüelas permanentes no sistema nervoso central^{104,191}.

Os efeitos nocivos do CO aparecem, principalmente, como consequência de sua combinação com a hemoglobina. Em 1895, Haldane demonstrou a importante relação entre CO e a hemoglobina, a formação da carboxiemoglobina (COHb) e o comprometimento do fornecimento de oxigênio às células^{82,83,127}.

Devido à diversidade e à amplitude dos processos industriais, que produzem ou usam monóxido de carbono, um grande número de trabalhadores se

expõe diariamente ao CO. Entre eles, podem ser citados, a fundição de metais, o craqueamento catalítico do petróleo em refinarias, os fornos de calcinação e os de recuperação de papel, a produção sintética do metanol e de outros compostos a partir do CO, além da produção de carbonetos e de formaldeído^{30,104}. Existem ainda, outras numerosas atividades que podem expor repetidamente os trabalhadores - bombeiros, guardas de trânsito, motoristas de táxi, operadores de empilhadeiras, mecânicos e soldadores em operações dentro de tanques - a concentrações consideravelmente altas de CO, suficientes para formar de 5 a 10% de COHb, mesmo em não-fumantes. O hábito de fumar constitui outra importante fonte de exposição humana ao CO, afetando não só o fumante como as pessoas que aspiram *passivamente* a fumaça do cigarro^{15,36,62,96,131,149,195}.

O monóxido de carbono proveniente da combustão interna nos veículos automotores tem contribuído significativamente para a poluição dos centros urbanos. Visando ao atendimento dos padrões de qualidade de ar, o Conselho Nacional do Meio Ambiente, em 1986, instituiu em caráter nacional o PROGRAMA DE CONTROLE DA POLUIÇÃO DO AR POR VEÍCULOS AUTOMOTORES (PROCONVE) que estabelece os limites máximos de emissão de CO para motores e veículos automotores em 24,0, 12,0 e 2,0 g/km rodado para 1990, 1992 e 1997, respectivamente²⁵.

O reconhecimento e a avaliação do risco ocupacional da exposição ao CO tornam obrigatória a adoção de medidas de proteção à saúde dos trabalhadores, entre as quais a implementação de programa de Higiene e Medicina do Trabalho nas indústrias. A monitorização biológica ocupa lugar de destaque, neste programa, permitindo averiguar a magnitude da exposição humana. A carboxiemoglobina é um indicador biológico (IB), que avalia a absorção (IB de dose interna) assim como reflete a intensidade do efeito nocivo do monóxido de carbono no organismo (IB de efeito).

A determinação de baixos teores de COHb, de ocorrência comum entre os indivíduos expostos ocupacionalmente e entre os fumantes, por um método simples, sensível e preciso, aplicável rotineiramente, apresenta dificuldades em nosso país, o que nos motivou a realizar este trabalho.

2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO AO MONÓXIDO DE CARBONO

O monóxido de carbono é um dos agentes químicos mais perigosos para o homem e para outros animais. Esta periculosidade está ligada diretamente às condições de exposição ao xenobiótico. Apesar de ser o mais abundante poluente gasoso das atmosferas urbanas, não é o de maior risco para a população em geral. Por outro lado, a exposição no ambiente de trabalho tem sido responsável por número significativo de intoxicações⁴⁷.

O grau da exposição ocupacional ao CO é intensificado pelo tipo de atividade física exercida no local de trabalho e pela susceptibilidade individual. A quantidade do xenobiótico absorvida pelo organismo depende também das características físicas e químicas da substância, da intensidade e frequência da exposição e de hábitos pessoais como o de fumar.

O conhecimento dos parâmetros que regem a absorção, distribuição e eliminação do xenobiótico no organismo é importante para estimar-se a biodisponibilidade do agente^{2,4,42,109,110}. Por outro lado, a elucidação do mecanismo de ação tóxica permite escolher o melhor indicador biológico (IB) para avaliação da exposição. Na monitorização biológica da exposição ao CO, dispõe-se de três IB: o CO no sangue, o CO no ar exalado e a carboxiemoglobulinemia¹¹².

2.1. Propriedades físicas e químicas

O monóxido de carbono [CAS 630-08-0] é um gás incolor, inodoro e insípido, pouco solúvel na água e com densidade menor que a do ar, ao qual se mistura sem estratificação. É inflamável e sua queima produz CO₂ com chama de coloração azul brilhante¹⁹⁰.

As principais propriedades físicas são^{5,80,104,132,137,189}:

- peso molecular :	28,01
- ponto de fusão :	-205,1 °C
- ponto de ebulição :	-191,5 °C
- densidade :	
a 0 °C, 1 atm	1,250 g/l
a 25 °C, 1 atm	1,145 g/L

- peso específico relativo ao ar: 0,967
- solubilidade em água, a 1 atm :

a 0 °C	3,54 mL/100mL
a 10 °C	2,82 mL/100mL
a 25 °C	2,14 mL/100mL
a 37 °C	1,84 mL/100mL
- limite de inflamabilidade no ar :

inferior	12,5 % (v/v)
superior	74,2 % (v/v)
- temperatura de ignição : 608,9 °C
- absorve radiação eletromagnética na região de infravermelho e a principal banda de absorção é a 4670 nm.

Em condições normais de temperatura e pressão (CNTP), o CO é gás quimicamente inerte, mas torna-se reativo em temperaturas mais elevadas, podendo atuar como agente redutor enérgico. A oxidação do CO a CO₂ é catalisada por paládio e por mistura de óxidos de cobre e magnésio. A concentração de CO no ar pode ser expressa em partes por milhão (ppm), porcentagem em volume (%) ou em mg/m³. Os fatores de conversão destas unidades são válidos para determinadas condições¹³⁷. A quantidade de CO e de O₂ dissolvida num líquido é freqüentemente representada pela pressão parcial, pCO e pO₂, e expressa em milímetros de mercúrio (mmHg), torricelli (Torr), pascal (Pa) ou milibar (milibar).

As equivalências entre as unidades de concentração de CO no ar e entre as de pressão constam no (anexo I).

2.2. Fontes naturais e antropogênicas

Entre as fontes naturais produtoras de CO, citam-se, como mais importantes, a oxidação do metano, a atividade vulcânica e a dos pântanos e as minas de carvão. Pequenas quantidades de CO são produzidas por vegetais, durante a germinação da semente e no crescimento da planta, e por certas algas marinhas^{127,137,160}.

O CO produzido na superfície da terra difunde-se da troposfera à estratosfera, onde é oxidado a CO₂¹⁰⁴. A permanência do CO na atmosfera é de,

aproximadamente, 2 meses e meio e os principais mecanismos de transformação ambiental são a oxidação a CO_2 no ar, a absorção pelo solo e pela vegetação e a dissolução em águas de rios, lagos e oceanos. Esta solubilidade depende, principalmente, da pressão parcial do gás na atmosfera e da temperatura da água.

A oxidação também ocorre por reações com contaminantes do ar e por microorganismos presentes no solo. A oxidação por bactérias anaeróbias a CO_2 , na ausência de H_2 , e a redução a metano, em presença de H_2 , também contribuem para a remoção do CO atmosférico^{101,127}.

O monóxido de carbono é produzido também pela atividade humana, através da queima de matéria orgânica - carvão, madeira, papel, óleo, gasolina, ou qualquer outro material que contenha carbono - quando há insuficiência de oxigênio. Portanto, as fontes de exposição ao CO podem ser consideradas onipresentes.

Se o processo de combustão ocorrer com excesso de oxigênio, não há formação significativa de CO. Contudo, se a chama da queima do material carbonado entrar em contato com superfície de temperatura inferior à de ignição, haverá formação de CO.

As fontes que resultam da atividade humana podem ser divididas em móveis e estacionárias.

As fontes móveis são representadas, principalmente, por veículos com motores a explosão, responsáveis por cerca de 55% a 66% das emissões artificiais de CO⁴⁴. Nos motores a gasolina, com ignição por faísca, o volume de CO na fumaça liberada para o ar atmosférico pode variar de 1 a 10% e, nos motores a diesel, com detonação por compressão, emite-se cerca de 0,1% de CO. Dependendo do ajuste do motor, sobrecarga ou falta de manutenção, as quantidades podem aumentar consideravelmente¹⁰⁴.

A infiltração e o acúmulo dos gases emitidos pelos veículos no seu interior podem ocorrer, acidentalmente, por deficiência no sistema de eliminação, expondo assim o homem a concentrações elevadas de CO^{9,101,136}.

A CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), no Relatório de Qualidade do Ar na Região Metropolitana de São Paulo e Cubatão, estima a contribuição relativa dos veículos a gasolina, álcool e diesel na

emissão de 1,391 milhões de toneladas de CO (1988) em 60, 12 e 16%, respectivamente. Os processos industriais e a queima ao ar livre representam apenas 6%⁴⁴.

Durante o inverno, as condições meteorológicas são desfavoráveis à dispersão dos poluentes atmosféricos^{3,47}. O fenômeno de inversão térmica e a precipitação pluviométrica pouco freqüente aumentam os problemas relacionados à poluição do ar. Motivada por estes fatores a CETESB implantou a OPERAÇÃO INVERNO de 1 de maio a 31 de agosto. Neste período, aumenta a vigilância no controle da qualidade do ar⁴⁴.

As fontes estacionárias incluem os processos industriais de produção e os de uso. O CO é produzido, em escala industrial, por oxidação parcial de hidrocarbonetos gasosos presentes no gás natural ou pela gaseificação do coque ou da hulha¹⁰⁴. Na indústria metalúrgica, o CO é usado como agente redutor, principalmente no processo de recuperação de níquel e nas fundições de ferro³⁰.

A redução do minério de ferro é realizada em alto forno, de funcionamento contínuo, carregado periodicamente com minério de ferro, calcário (CaCO_3) e coque (carbono). Na decomposição térmica do calcário, produz-se o óxido de cálcio que reage com as impurezas de sílica e silicato formando-se a escória de silicato. O ferro fundido e a escória pouco densa saem por aberturas de separação, localizadas na parte inferior do forno. O ar quente injetado queima o carbono, formando CO, o principal agente redutor. O gás do alto forno contém, cerca de 24% de CO, que participa das reações de redução do ferro¹⁶⁶:

Obtém-se assim o ferro gusa que contém, em média, 5% de impurezas em Si, P, Mn e S. Os diferentes processos de purificação do ferro gusa diferenciam o tipo de liga metálica formada, quanto ao grau de dureza e de tenacidade. Estes são determinados pela composição de metais e pela quantidade de carbono. O processo de purificação é dependente da finalidade de uso da liga metálica¹⁶⁶.

A fumaça do tabaco é fonte de CO de grande importância, visto a larga difusão do hábito de fumar na sociedade^{92,159}. GUILLERM *et al*⁸¹ e MUMPOWER *et al*¹³⁰, com base na quantidade média de fumaça inalada, sua retenção pulmonar e frequência da tragada, calcularam ser a quantidade inalada por cigarro comparável à exposição a 450 ppm de CO no ar durante 6 minutos. O número e o tipo de cigarro, assim como a intensidade da tragada, condicionam a fração de CO disponível para a absorção pulmonar.

A concentração de CO na fumaça de cigarro é de 3 a 6%, variando com a temperatura da queima e outros fatores como a porosidade do papel e o tipo do tabaco⁷. Em cachimbo ou charuto, a sua concentração na fumaça é duas a três vezes maior, por ser a temperatura da queima inferior à do cigarro. Entretanto, o usuário de cachimbo ou de charuto tende a estar exposto a menores quantidades do toxicante, uma vez que, usualmente, a fumaça não é tragada¹⁵⁹.

KARNIK & COIN⁹⁸ simularam a exposição de voluntários não-fumantes à fumaça de um cigarro, e encontraram o aumento médio de COHb imediatamente e 20 minutos após a inalação da última tragada, de 0,8 e 0,5 %, respectivamente.

O monóxido de carbono é produzido, endogenamente, no catabolismo normal da hemoglobina e de outros heme-compostos (mioglobina e citocromos), pela conversão do grupo heme a biliverdina, por remoção do átomo de carbono da metila em posição alfa²⁰⁵. WOLFF & BIDLACK²¹² evidenciaram outras possíveis fontes endógenas, como a peroxidação lipídica.

Estima-se que a concentração de carboxiemoglobina formada pelo CO endógeno, em adulto sadio, varia de 0,1 a 1,0%, sendo aproximadamente 75% atribuído ao catabolismo da hemoglobina¹⁶⁰.

Durante a fase progesterônica do ciclo menstrual e durante a gravidez, podem ser encontradas concentrações elevadas de CO endógeno. Mulheres grávidas produzem 0,9 mL/h de CO e as não-grávidas, 0,4 mL/h. Estes teores parecem estar relacionados com os níveis de progesterona¹³⁷.

Em algumas condições patológicas ocorre aumento na produção de CO endógeno como, por exemplo, na anemia hemolítica que origina teores de até 6% de COHb^{5,47}. Os hematomas, a exposição a agentes hemolíticos, os traumatismos e as transfusões sangüíneas incrementam os níveis de

carboxiemoglobinemia⁷⁶. A medula óssea pode converter-se em importante fonte de CO nas hemopatias, como a anemia sideroblástica, imputada ao comprometimento da eritropoiese²⁰⁶.

A produção total de CO endógeno pode ser acentuada por certos fármacos como a difenilidantoína e o fenobarbital, em consequência da indução do heme hepático seguido de seu catabolismo. Em casos de porfiria cutânea, verifica-se efeito similar^{160,206}.

2.3. Mecanismo de ação

O monóxido de carbono é o exemplo mais conhecido de agente que interfere na capacidade de transporte de oxigênio do sangue, conduzindo à anoxia ou hipóxia tissular^{132,179}.

A hipóxia produzida é do tipo anêmica (anoxemia isotônica) e caracteriza-se pela diminuição da quantidade de O₂ transportada pela hemoglobina, sendo que a pressão parcial de oxigênio e o fluxo sangüíneo podem permanecer normais ou até elevados^{8,106,179}.

O monóxido de carbono é rapidamente absorvido e liga-se, reversivelmente, à hemoglobina dos eritrócitos, formando a carboxiemoglobina. Ele também compete com o oxigênio, em nível tissular, pelo mesmo sítio ativo das hemoproteínas celulares, que têm em comum a configuração estrutural tetrapirrólica, tais como a mioglobina, o citocromo-oxidase, o citocromo P-450, a peroxidase e a catalase. Para tanto, é necessário que o CO do compartimento intravascular passe, por difusão, para o extravascular^{5,31}.

A hemoglobina, proteína oligomérica, possui quatro cadeias polipeptídicas e quatro grupos heme - anel porfirínico no qual o átomo de ferro está no estado ferroso (Fe⁺²). A porção protéica, chamada globina, consiste de 2 cadeias α e 2 β ^{113,123,144}. O grupo heme está ligado à cadeia polipeptídica através de uma ligação de coordenação do átomo de ferro ao grupo R* de um resíduo** da histidina. A sexta ligação de coordenação do átomo de ferro de cada heme é livre e pode ser

* Cadeia lateral específica de cada aminoácido

** Unidade de cada aminoácido em um peptídeo

completada com o oxigênio ou o monóxido de carbono. Portanto, cada molécula de Hb pode combinar-se com 4 moléculas de O₂ ou de CO (figura 1).

Figura 1 - (a) ligação do oxigênio (O₂) ou monóxido de carbono (CO) ao ferro de um dos quatro grupos heme da hemoglobina³¹; (b) fórmula estrutural do grupo heme¹¹³; (c) geometria de coordenação octaédrica que permite a 5ª ligação do átomo de ferro com o resíduo da histidina da globina e a 6ª ligação com o CO ou O₂^{31,113}.

Apesar da capacidade de ligação ser de quatro moléculas, a equação da reação do O₂ ou de CO à Hb é usualmente escrita considerando apenas uma cadeia polipeptídica:

Na ligação da Hb com O₂ (X) ou com o CO (Y), as formas intermediárias possíveis até à saturação podem ser diagramadas em forma de triângulo. Na **figura 2** a linha horizontal superior representa a ligação com o O₂ na ausência de CO e a linha vertical à esquerda, o inverso. As outras combinações possíveis dos dois ligantes nos quatro sítios de ligação da Hb estão representadas nas *diagonais* do triângulo.

A ligação e dissociação do oxigênio ou do monóxido de carbono às hemoproteínas são influenciadas por alguns fatores, tais como as pressões parciais

dos gases e as características estruturais de cada proteína^{55,128}.

Figura 2 - Diagrama das combinações possíveis entre os ligantes CO (Y) e O₂ (X) e a hemoglobina (Hb)⁵⁵.

A curva de dissociação da oximioglobina apresenta o aspecto sigmóide (**figura 3**). Na primeira etapa da dissociação, em condições fisiológicas, o oxigênio é rapidamente dissociado da Hb. A diferença de pO₂ do sangue arterial (100 mmHg) para o venoso (40 mmHg) representa a liberação de O₂ para os tecidos de, aproximadamente, 5 mL/100 mL de sangue, proporcionando, portanto, um excelente fator de segurança no suprimento de O₂ aos tecidos¹¹³.

Além de transportar o O₂ dos pulmões aos tecidos, a Hb transporta dois produtos finais da respiração celular, o H⁺ e o CO₂, dos tecidos para os pulmões e rins, órgãos encarregados de excretá-los.

A função característica de cada hemoproteína está condicionada à sua conformação. A mioglobina e os citocromos têm estrutura protéica monomérica, com um sítio de ligação. Estas hemoproteínas intracelulares, apresentam maior afinidade pelo O₂ do que a Hb e exercem a função de reserva e de utilização deste gás em processos metabólicos.

A hemoglobina possui estrutura tetrâmera, permitindo que os quatro sítios ativos de ligação com os gases apresentem a interação cooperativa entre si. A ligação do O₂ à Hb é facilitada gradativamente, à medida que os sítios, ativos vão

sendo ocupados e, inversamente, a dissociação é dificultada, à medida que o oxigênio é liberado dos sítios. Neste processo de associação/dissociação do O_2 ou do CO ocorre uma mudança conformacional na estrutura da Hb^{72,151}.

Figura 3 - Curva de dissociação da hemoglobina (Hb) a 37°C, (pH=7,4)¹¹³.

O hidrogênio e o dióxido de carbono não se ligam ao mesmo sítio de ligação do oxigênio na molécula de Hb. O hidrogênio liga-se ao grupo R dos resíduos da lisina 146 das cadeias β e a dois resíduos nas cadeias α . O dióxido de carbono é captado pelo grupo α -amino na extremidade amino-terminal de cada uma das 4 cadeias polipeptídicas da Hb, formando a carbaminoemoglobina.

Nos capilares dos tecidos periféricos, a afinidade da Hb pelo O_2 diminui à medida que se liga ao H^+ ou ao CO_2 ; nos capilares pulmonares ocorre o inverso, com aumento da afinidade pelo O_2 à medida que o CO_2 e o H^+ são eliminados. Os íons H^+ , o CO_2 e o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) são efetores alostéricos que modulam a ligação do O_2 e do CO à hemoglobina (**figura 4**).

O efeito do pH na ligação do O_2 à hemoglobina, EFEITO BOHR, foi descoberto pelo fisiologista dinamarquês, Christian Bohr (**figura 5**)^{31,72,113,123,151,196}.

Dotada de baixa afinidade pelo O_2 , significativo efeito Bohr e elevada afinidade pelo CO, a hemoglobina corresponde perfeitamente às exigências fisiológicas de transportar O_2 às células, fornecendo-o às enzimas de respiração, e

de remover o CO_2 , produto terminal da atividade metabólica^{106,113,196}.

Figura 4 - Ação dos efetores alostéricos - H^+ , CO_2 e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) - na ligação do O_2 ou CO à hemoglobina (Hb) nos capilares tissulares e pulmonares¹²³.

Figura 5 - Efeito da concentração hidrogeniônica (pH) na curva de dissociação da oxiemoglobina de sangue humano - EFEITO BOHR¹¹³.

Outra função importante da Hb é a de remover o CO produzido endogenamente na célula. A liberação do CO da Hb e a eliminação por via pulmonar depende das diferenças de pressão parcial de CO no sangue venoso e no ar alveolar^{31,205}.

A elucidação do mecanismo de ação do CO feita por Claude Bernard, em 1865, foi formalizada por HALDANE & SMITH⁸³, em 1897^{31,179}. HALDANE & DOUGLAS⁸², em 1912, propuseram as leis relativas à ligação do CO e do O₂ à hemoglobina humana.

A primeira lei estabelece que a razão entre as moléculas de monóxido de carbono (Y) e de oxigênio (X) ligadas à hemoglobina é proporcional à razão das pressões parciais dos dois gases, como expresso abaixo :

$$\frac{Y}{X} = M \times \frac{pCO}{pO_2}$$

onde, M é a constante de proporcionalidade denominada coeficiente de partição ou constante de afinidade relativa³¹. Esta relação define quantitativamente a competição entre o oxigênio e o monóxido de carbono pelo mesmo sítio de ligação na hemoglobina⁸².

A constante de afinidade pode ser expressa como sendo o número de moles de O₂, para cada mol de CO, necessários à saturação da hemoglobina em 50% de O₂Hb. O valor determinado por HALDANE & DOUGLAS⁸² para a constante M no sangue humano foi de 246. Os valores encontrados na literatura oscilam entre 200 e 300, o que pode ser atribuído às diferentes condições experimentais³¹(tabela I).

Tabela I - Valores da constante de afinidade relativa (M) do CO e O₂ para a hemoglobina³¹.

M	autor
210 + 2,5	Sendroy <i>et al.</i> (1929)
233 a 272	Killick (1936)
204 + 10	Lihenthal & Riley (1946)
255	Allen & Root (1946)
218 + 8	Rodkey <i>et al.</i> (1969)

Cada espécie animal tem um valor definido para esta constante, imputado às diferenças na composição das moléculas de Hb^{80,179}.

A segunda lei que relaciona à ligação do O₂ e do CO à Hb, é consequência da primeira e diz que a saturação total (T) é função somente da pressão parcial de O₂ e de CO.

$$[T] = [Y] + [X] = f(pO_2 + M pCO)$$

De acordo com as leis de Haldane, espera-se que a curva de ligação da Hb com o CO seja paralela à do O₂ e que a distância entre as duas seja correspondente ao valor de M.

HALDANE questionou a diferença entre o estado clínico do paciente intoxicado pelo CO e o devido à anoxia provocada por diminuição no conteúdo hemoglobínico com nível de oxigênio no sangue equivalente. O autor observou que, em situações de pO₂ baixa, o CO dificulta a dissociação do oxigênio da Hb⁸⁰. Este fenômeno, denominado EFEITO HALDANE, indica desvio à esquerda na curva de dissociação da O₂Hb na presença de quantidades crescentes de CO. A forma sigmóide da curva de dissociação tende à forma parabólica^{12,31} (figura 6).

Figura 6 - Curva de dissociação da oxiemoglobina (O₂Hb) na presença de diferentes porcentagens de carboxiemoglobina (COHb) e em sangue de indivíduo anêmico³¹.

A Haldane foi atribuído o mérito do reconhecimento dos dois mecanismos pelos quais o CO conduz à anoxia :

- a redução no transporte de O₂ ao tecido devido à formação de COHb ;
- a diminuição na liberação de O₂, em nível tissular, pelo desvio da curva de dissociação da O₂Hb à esquerda.

BARCROFT¹³, em 1928, descreveu uma diferença leve, porém distinta, entre as curvas de dissociação de O₂Hb e COHb no sangue total, particularmente a *baixas saturações*. No entanto, os dados disponíveis não eram suficientemente confiáveis e somente mais tarde, em 1976, sua observação foi confirmada com maior segurança^{94,135,162}.

ROUGHTON¹⁶¹ confrontou o aspecto teórico da interação da Hb com o CO ou O₂ com base na teoria da formação de compostos intermediários, em quatro etapas, de Hb₄ a Hb(CO)₄, através da mesma teoria proposta por ADAIR¹ para a ligação da Hb com o O₂.

Cada reação se caracteriza por uma constante de equilíbrio L que é obtida pela razão das constantes de velocidade de associação e dissociação k e k' respectivamente:

onde, Hb_4 representa uma molécula de hemoglobina com quatro sítios de ligação.

De acordo com esta hipótese, a equação geral que descreve o equilíbrio entre hemoglobina livre e ligada ao CO é dada por³¹ :

$$\frac{Y}{100} = \frac{L_1 P + 2 L_1 L_2 P^2 + 3 L_1 L_2 L_3 P^3 + 4 L_1 L_2 L_3 L_4 P^4}{4 (1 + 4P + L_1 L_2 P^2 + L_1 L_2 L_3 P^3 + L_1 L_2 L_3 L_4 P^4)}$$

Nesta equação, $Y/100$ indica a percentagem de saturação da Hb com o CO, P a pressão parcial de CO em mmHg e L a constante de equilíbrio, de 1 a 4, correspondente aos 4 estágios intermediários.

Considerando esta base teórica, ROUGHTON *et al.*¹⁶⁴ desenvolveram métodos analíticos mais sensíveis para construir a curva de dissociação da oxiemoglobina e carboxiemoglobina, calculando em seguida as constantes de equilíbrio L_1 , L_2 , L_3 e L_4 .

Dispondo dos valores das constantes de equilíbrio para o monóxido de carbono (L), ROUGHTON¹⁶³ verificou que a primeira lei de Haldane podia manter-se confirmada somente quando a Hb está saturada (com 4 ligantes) :

$$M = \frac{L_4}{K_4} = \frac{l'_4 \times k_4}{k'_4 \times l_4}$$

onde, L_4 e K_4 representam a constante de equilíbrio do 4º estágio da reação da Hb com CO e O_2 respectivamente; l'_4 e k'_4 são as correspondentes constantes de velocidade e de associação e l_4 e k_4 as de dissociação.

DI CERA *et al.*⁵⁴ compararam as curvas de ligação da Hb com o CO e o O₂ nas mesmas condições, próximas às fisiológicas, e demonstraram que não são paralelas, o que corrobora a restrição da validade das leis de HALDANE para a ligação entre CO e O₂ à Hb humana.

As velocidades de ligação e dissociação do oxigênio à hemoglobina são maiores que as do CO; no entanto, a de dissociação é significativamente maior. Segundo FORSTER⁶⁹, a razão das constantes de velocidade de associação da hemoglobina com o CO e o O₂ é da ordem de 1/6, enquanto que, para a dissociação, a razão diminui para 1/1800.

A constante *M*, determinada a pressões parciais elevadas, está de acordo com estudos prévios de HALDANE, mas está diminuída a baixas pressões parciais dos gases⁵⁴.

BISHOP & GIL²² determinaram os valores de *M*, isoladamente, para as cadeias α e β . Estes valores foram concordantes com os de 123 ± 34 e 241 ± 19 , obtidos por DI CERA *et al.*⁵⁴ para a hemoglobina antes e após a transição conformacional, respectivamente. Com base nestes dados estes autores sugerem que a ligação do primeiro ligante ocorre, preferencialmente, na cadeia α .

Apesar de ser aparentemente simples, o mecanismo de ligação do CO à Hb envolve os efeitos da estrutura quaternária, da geometria do ligante e das diferenças nas cadeias polipeptídicas moduladas por interações do heme não ligado e pelo impedimento estérico. A variação da conformação da cavidade de localização do heme na hemoglobina, que acompanha a transição do íon ferro da desoxiemoglobina (número de coordenação 5) para a forma ligada (número de coordenação 6), aumenta o impedimento estérico distal para o ligante.

As diferenças entre as constantes *L*₁, *L*₂, *L*₃ e *L*₄ dependem também de forças intramoleculares resultantes da interação dos ligantes entre si, ou entre outras porções da molécula de hemoglobina¹²⁸.

DI CERA *et al.*⁵⁴ e GILL *et al.*⁷³ observaram que as espécies de hemoglobina triplamente ligadas com CO e/ou O₂ formavam-se em pequena proporção. Com base no mecanismo estereoquímico proposto por PERUTZ¹⁴³, os autores sugerem que este comportamento seja devido a uma propriedade intrínseca da molécula de Hb.

A variação da constante de afinidade relativa do O_2 e do CO , em função das pressões parciais dos gases, para a hemoglobina de indivíduo adulto e para a hemoglobina fetal, quando representada graficamente, gera uma superfície não plana⁵⁴ (figura 7).

Figura 7 - Constante de afinidade relativa (M) do CO e O_2 para a hemoglobina normal de adulto (HbA) e para a fetal (HbF) em função das pressões parciais dos gases⁵⁴.

Em resumo, com base nas constantes de equilíbrio da ligação da Hb com o O_2 e o CO e nas leis termodinâmicas, os autores comprovaram que a validade das leis de Haldane se restringe a moléculas de Hb com 4 ligantes^{22,54,55,128,163}.

O monóxido de carbono se liga à mioglobina (Mb) em menor proporção que à hemoglobina. A Mb é uma hemoproteína formada por uma cadeia polipeptídica com apenas um sítio de ligação; portanto, não apresenta efeito de cooperatividade²¹⁵.

A reação da Mb com o O_2 apresenta equilíbrio químico e pode ser expressa por^{31,137}:

onde k' e k são, respectivamente, as constantes de velocidade de associação e

dissociação.

A constante de partição (M') entre O_2 e CO para a mioglobina também é dada pela primeira lei de Haldane:

$$\frac{COMb}{O_2Mb} = M' \times \frac{pCO}{pO_2}$$

onde M' tem valor de aproximadamente 40.

A curva de dissociação da O_2Mb apresenta a forma hiperbólica e não é influenciada pela concentração hidrogeniônica.

COBURN *et al.*⁴⁰ determinaram a razão entre o CO no tecido muscular e no sangüíneo como função da pO_2 arterial. Esta razão foi de 1 para o músculo esquelético e de 3 para o cardíaco. Assim, um indivíduo com 10% de COHb pode apresentar 30% de COMb no músculo cardíaco^{101, 127, 137}.

As conseqüências funcionais da saturação da Mb pelo CO não estão bem definidas¹⁸⁷. WILKS²⁰⁸ relata que a Mb além de armazenar O_2 , exerce a função de facilitar a difusão do O_2 para o interior das fibras musculares.

Dentre as outras hemoproteínas com as quais o CO pode se ligar, as de maior importância são o citocromo-oxidase, o citocromo P-450, a catalase e a peroxidase.

A reação do monóxido de carbono com a enzima citocromo-oxidase, na forma reduzida, pode inibir a função respiratória na mitocôndria, diminuindo a utilização total de oxigênio em nível celular. Nestas condições, ocorre a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical peróxido ($:O_2^-$), os quais são tóxicos à célula por danificarem a estrutura da membrana. O citocromo-oxidase é responsável pela transferência de elétrons na cadeia respiratória e somente ele pode reagir diretamente com o oxigênio.

COOPER *et al.*⁴⁶ relataram que a proporção de CO e O_2 necessária à inibição de 50% da atividade enzimática se aproxima de 1 para o citocromo-oxidase e de 2,2 a 2,8 para o citocromo a_3 . A importância do efeito do CO sobre as hemoproteínas intracelulares é ressaltada pela hipótese de serem suas afinidades

pelo CO aumentadas em condições de pO_2 tissular diminuída.

O aumento de 10% de COHb pode tornar mais significativa, fisiologicamente, tal ligação, ainda que o consumo de O_2 possa permanecer inalterado com 50% de inibição do citocromo a_3 ⁶⁹.

De maneira similar, o citocromo P-450, considerado o mais importante sistema enzimático envolvido nas reações da *fase I* de biotransformação, pode reagir com o CO. TRELA *et al.*^{193,194} demonstraram *in vitro* que as reações das diferentes isoenzimas do citocromo P-450 não são influenciadas de igual maneira pelo CO. Este fato explica a variação na inibição da biotransformação de diferentes fármacos após a exposição ao monóxido de carbono¹⁷⁶.

A reação do CO com a peroxidase e a catalase é pouco significativa, porque ocorre com as formas reduzidas das enzimas e estas são prontamente oxidadas no organismo.

2.4. Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação

A absorção do CO através da membrana alveolar é rápida, sendo praticamente nula nas vias aéreas superiores^{5,173}. Cerca de 80% do CO absorvido se liga reversivelmente à Hb e o restante à mioglobina (15%) e às outras hemoproteínas (5%), particularmente as hepáticas. Em situação de hipóxia tissular, ocorre aumento na porcentagem de CO ligado à mioglobina^{6,127,191}.

A velocidade de absorção e o correspondente aumento na concentração de COHb dependem, principalmente, do tempo de exposição e da concentração de CO no ar. O tipo de atividade física altera o ritmo respiratório e, conseqüentemente, a ventilação alveolar, fator importante na absorção pulmonar do CO. No estado de repouso físico é absorvida apenas a metade da quantidade inalada (**figura 8**)^{5,127,182}.

Desta forma, numa exposição a concentração constante de CO, o tempo necessário para atingir o equilíbrio entre a absorção e a eliminação será influenciado pela ventilação pulmonar; o aumento mais significativo na % de COHb ocorre nas 3 primeiras horas de exposição^{5,137,179}.

Figura 8 - Relação entre o nível de carboxiemoglobina (COHb) e o tempo de exposição em diferentes concentrações de monóxido de carbono nas condições de repouso e de trabalho pesado¹⁸².

O estudo da cinética da absorção e da eliminação do CO tem fornecido a base necessária para a proposição de modelos matemáticos, que permitem estabelecer relações entre os níveis de exposição e a quantidade de gás no sangue³¹.

Vários autores descrevem equações matemáticas com as quais é possível, considerando-se as variáveis físicas e fisiológicas, estimar a absorção de CO e a formação da COHb em função do tempo de exposição^{39,68,114,138} (**anexo II**).

A equação de FORBES *et al.*⁶⁸ é uma das mais simples e, portanto, a mais usada na prática. Esta relaciona a concentração de COHb como função linear da concentração de CO no ar inalado [% CO] e do tempo de exposição (t) em minutos. Antes de se estabelecer o equilíbrio, a variação na porcentagem de COHb numa determinada exposição pode ser calculada por:

$$\Delta \text{COHb (\%)} = K \times [\text{CO}] \times t$$

O valor de **K** varia de acordo com o tipo de atividade física, sendo de 3, 5, 8 e 11 para as condições de repouso, trabalho leve, moderado e pesado, respectivamente, para a concentração de CO deve ser expressa em %.

A carboxiemoglobinemia decorrente da produção endógena ou do

hábito de fumar influi na velocidade de absorção de CO antes de ser estabelecido o equilíbrio, uma vez que a absorção é regida pelas pressões parciais dos gases no ar e no sangue¹⁰¹.

Cerca de 80% do CO formado na queima do cigarro, que corresponde aproximadamente a 7 mL de CO por cigarro, é absorvido. A concentração de COHb em indivíduos fumantes varia em média de 3,8 a 6,8%. Em fumantes de vida sedentária, o nível pode ser ainda mais elevado, tendo sido detectados teores de até 15%¹³⁷.

Indivíduos idosos podem apresentar diminuição da absorção e/ou eliminação pela alteração da capacidade de difusão da membrana alveolar, ocasionada por enfisema ou outra doença pulmonar obstrutiva crônica¹³⁷.

Menos de 1% do CO absorvido é oxidado a dióxido de carbono, e eliminado pelos pulmões, juntamente com o agente tóxico inalterado^{9,16}.

O monóxido de carbono não se acumula no organismo sendo eliminado após cada exposição, mantendo o equilíbrio com o ar ambiente. Se este não contiver CO, a sua eliminação dar-se-á completamente, até os níveis de carboxiemoglobulinemia decorrentes da produção endógena^{104,179}.

Em contraste às detalhadas informações sobre a absorção de CO, existem poucos estudos experimentais relativos à sua eliminação em humanos ou em animais. Entretanto, os mesmos fatores determinantes da absorção devem atuar, também, na eliminação¹³⁷.

A maioria dos autores aceita que a eliminação se faz segundo uma curva exponencial. Os valores da meia-vida biológica ($T_{1/2}$), para a condição de repouso, variam de 3 a 4 horas; com a inalação de oxigênio puro, esse tempo cai para 1 hora ou para 23 minutos se a pressão for de 3 atmosferas^{16,74,127,202}.

MALORNY *et al*¹¹⁹ avaliaram a influência de diferentes composições de ar inspirado no tempo de eliminação de 50% do CO em animais com elevada carboxiemoglobulinemia (60 a 74%). As $T_{1/2}$ de eliminação obtidas foram de 41, 28 e 19 minutos, respectivamente, para as condições de inalação de ar ambiente, oxigênio puro e mistura de O₂ com 5% de CO₂.

PETERSON & STEWART¹⁴⁶ expuseram 39 voluntários a

concentrações de CO que variaram de 1 a 1000 ppm, durante 0,25 a 24 horas, com colheita de amostras de sangue até 23 horas após a exposição. Os autores reportaram T 1/2 de eliminação média de 5,3 horas concluindo que a mesma não depende do teor inicial de COHb no sangue, da duração da exposição, do número de exposições ou da concentração no ar inalado⁵.

As evidências experimentais sugerem que a velocidade de eliminação varia de acordo com o sexo, sendo maior para as mulheres. RODE *et al.*¹⁵⁶ criticaram o fato de se determinar a T 1/2 de eliminação indistintamente para homens e mulheres. Com base em análise de dados de indivíduos fumantes propuseram valores de 3,7 horas para homens e de 2,5 horas para mulheres.

A meia-vida biológica da COHb varia inversamente com a pO₂ no ar ambiente. Em indivíduo adulto, sadio, sedentário e ao nível do mar, é de 4 a 5 horas, podendo ser reduzida por um aumento da ventilação alveolar^{4,16,160}.

2.5. Efeitos tóxicos

A formação da carboxiemoglobinemia e o aparecimento de sinais e sintomas clínicos depende, principalmente, da concentração do monóxido de carbono no ar, do tempo de exposição, do tipo de atividade física e da susceptibilidade individual. Os efeitos do monóxido de carbono estão diretamente relacionados à concentração de carboxiemoglobina no sangue e com o grau de hipóxia ou anoxia tissular (**tabela II**).

A intoxicação aguda, observada em acidentes ou suicídios, é relatada por vários autores^{149,174,203}. A exposição a concentrações elevadas de CO pode levar à perda da consciência quase que instantaneamente. Concentrações de 10000 a 40000 ppm de CO levam à morte em poucos minutos e acima de 50000 ppm pode ocorrer morte por arritmia cardíaca antes do aumento significativo da carboxiemoglobinemia^{127,160}. A **tabela III** relaciona o tempo mínimo de exposição, em diferentes concentrações de CO no ar, aos sinais e sintomas observados.

Os órgãos críticos à ação de CO são o cérebro e o coração, que dependem de suprimento contínuo e ininterrupto de oxigênio. O coração é afetado por dois mecanismos: trabalho aumentado para prover a demanda periférica de oxigênio e redução no seu próprio suprimento^{102,104,187,191}.

Complicações neurológicas ou cardiovasculares podem resultar de episódios de intoxicação aguda, evidentes após a recuperação do paciente⁸⁶.

Tabela II - Principais sinais e sintomas relacionados à carboxiemoglobinemia¹⁰⁴.

carboxiemoglobinemia (%)	sinais e sintomas*
0,3 a 0,7	Nenhum sinal ou sintoma. Níveis normais de COHb devido à produção endógena.
2,5 a 5,0	Nenhum sintoma. Aumento compensatório no fluxo sanguíneo a certos órgãos vitais. Pacientes com doença cardiovascular grave podem ter necessidade da reserva compensatória. <i>Angina pectoris</i> é provocada ao menor esforço físico.
5,0 a 10,0	Percepção visual diminuída.
10,0 a 20,0	Tensão frontal. Ligeira cefaléia. Resposta anormal ao estímulo visual. Possivelmente falta de respiração ao esforço físico. Pode ser letal para o feto e para pacientes com doença cardíaca grave.
20,0 a 30,0	Cefaléia leve ou prolongada e latejamento nas têmporas. Rubor. Náusea. Destreza manual fina anormal.
30,0 a 40,0	Cefaléia forte, vertigem, náusea e vômito. Fraqueza. Irritabilidade e diminuição do discernimento.
50,0 a 60,0	Possivelmente coma com convulsões intermitentes e respiração tipo " <i>cheyne-stokes</i> ".
60,0 a 70,0	Coma com convulsões intermitentes. Respiração diminuída e ação cardíaca. Possivelmente morte.
70,0 a 80,0	Pulso fraco e respiração lenta. Depressão do centro respiratório levando à morte.

(*) Existe considerável variação individual na ocorrência dos sintomas.

Tabela III - Tempo mínimo de exposição, em minutos, às diferentes concentrações de monóxido de carbono no ar para o aparecimento de sinais e sintomas^{85,104}.

sinais e sintomas	concentração de monóxido de carbono no ar (ppm)						
	200	500	800	1600	3200	6400	12800
dor de cabeça	50 a 180	20 a 120	45	20	5 a 10	1 a 2	
tontura e náusea		20 a 120	45	20	5 a 10	1 a 2	
perda da consciência			120	120	30	15	1 a 3
morte				120	30	15	1 a 3

Estudos histopatológicos, em casos fatais, mostram a predominância de lesões no tecido branco do SNC, ao contrário das lesões em nível neuronal encontradas em pessoas após intoxicações não fatais^{104,141,191}. Pneumonia pode ser desenvolvida poucas horas ou dias após o episódio da intoxicação; também pode ocorrer glicosúria ou albuminúria temporária. Distúrbios renais agudos que complicam a recuperação do intoxicado são de rara ocorrência, assim como as manifestações cutâneas. Estudos com animais indicam que a hipotensão pelo CO pode comprometer o fluxo sanguíneo e exacerbar a acidose metabólica^{104,141}.

Após uma intoxicação aguda pelo CO, o paciente apresenta algumas vezes, edema pulmonar ou cerebral de extensão variável, com dano irreversível^{141,191}. Após a recuperação, pode apresentar efeitos retardados como a alteração do comportamento, confusão, desorientação, febre e distúrbios neurológicos. Estes são, principalmente; ataxia, tremores lembrando a doença de Parkinson, incoordenação e fraqueza, com evolução progressiva, podendo culminar com a morte em poucas semanas^{8,104}. Nos primeiros estágios da intoxicação, o paciente parece pálido; posteriormente, a pele, a base das unhas e as mucosas podem se tornar vermelho-cereja devido à COHb aumentada. Este sinal pode ser observado em concentrações acima de 30% de COHb embora não seja confiável nem constante. O paciente apresenta pulso acelerado e hiperpnéia leve ou ausente, mesmo em níveis superiores a 50% de COHb^{104,141}.

As intoxicações que não levam à perda de consciência podem, no entanto, resultar em morte de células cerebrais com alguns sintomas, tais como, cefaléia, tontura, irritabilidade e prejuízo da memória; pode ainda sobrevir mudança de personalidade ou estado de fraqueza nos membros. Grande número de casos não chegam a ser diagnosticados como intoxicação pelo CO⁸⁹.

PENNY ¹⁴¹ concluiu que a intoxicação aguda por CO resulta em progressiva hipotensão, provavelmente como resultado da profunda vasodilatação periférica. O batimento cardíaco usualmente aumenta no início da exposição, diminuindo com o aumento da % de COHb. A taquicardia, presumivelmente, resulta da estimulação simpática geral como resposta reflexa da queda da pressão arterial, enquanto a bradicardia parece ser devida à hipoxia no miocárdio.

Ao contrário da intoxicação aguda, a ocorrência de intoxicação em exposição prolongada a baixas concentrações de CO é muito discutida na literatura e pouco documentada^{102,170,203}. HANIG & HERMAN⁸⁶ relatam que nestas condições o CO pode afetar a estrutura dos vasos sanguíneos, o que pode promover o desenvolvimento da aterosclerose.

Os estudos experimentais de exposição a longo prazo em animais são de difícil extrapolação para o homem, pois, além das diferentes respostas interespecies, há variação na ventilação pulmonar que altera significativamente a absorção de CO¹¹¹.

Indivíduos que são repetidamente expostos ao CO podem desenvolver mecanismos de compensação semelhantes àqueles submetidos à hipóxia decorrente de altitudes elevadas^{178,204}.

Os principais mecanismos de adaptação à hipóxia envolvem alterações na curva de dissociação do oxigênio da hemoglobina, no fluxo sanguíneo e no teor de hemoglobina. O desvio à direita, observado em indivíduos que moram em altitudes elevadas, pode ser provocado pelo aumento da concentração de 2,3-difosfoglicerato na célula vermelha. Desvio similar é observado em pacientes com doenças arteri coronárias. A liberação de O₂ para os tecidos periféricos pode ser preservada por aumento de fluxo sanguíneo, que constitui o principal mecanismo de adaptação à hipóxia^{12,204}.

Nos últimos anos vêm sendo realizados estudos sobre os efeitos do monóxido de carbono em exposições prolongadas a baixas concentrações (teores de COHb <10%) em indivíduos sadios ou com distúrbios cardiovasculares ou pulmonares^{52,104,125}. Os sistemas nervoso central, cardiorrespiratório e límbico são os mais estudados nessas condições. No cérebro as áreas mais susceptíveis são os gânglios basais e o hipotálamo^{8,86}.

O neurônio é uma célula de alta taxa de metabolismo, mas com pouca

capacidade para metabolismo em anaeróbiose. O consumo de oxigênio dos neurônios é dez vezes maior que o do tecido glial. Os danos aos neurônios começam poucos minutos após a interrupção do fluxo sanguíneo ao cérebro e a morte de alguns neurônios ocorre anteriormente à falta total de O_2 . Certas células são mais susceptíveis à anoxia de que outras; em ordem crescente têm-se neurônios, oligodentrócitos, astrócitos, mieroglia e células do endotélio capilar⁸.

Episódios repetidos de anoxia afetam a barreira hematencefálica e conduzem ao desenvolvimento de esclerose difusa da matéria branca, ou leucoencefalopatia. Ainda em condições de hipóxia, o coração é solicitado a aumentar a força de contração e a frequência cardíaca no intuito de suprir o fornecimento do oxigênio aos tecidos periféricos; este aumento na atividade do miocárdio demanda quantidade de oxigênio ainda maior através da circulação coronária¹³².

Em condição de repouso, os tecidos periféricos absorvem, em média, 25% do conteúdo de oxigênio e o miocárdio, 75%. O sangue venoso dos tecidos periféricos tem pO_2 de 40 mmHg, enquanto o da circulação coronária é de 20 mmHg. Desta forma, o metabolismo aeróbico do miocárdio é mantido até determinada condição de hipóxia. Nesta condição, o miocárdio tende a aumentar somente o fluxo sanguíneo, enquanto que os tecidos periféricos aumentam a absorção de oxigênio. Assim sendo, um indivíduo com doença coronariana torna-se mais susceptível à hipóxia do tecido muscular cardíaco¹³².

A influência das variações circadianas nos efeitos tóxicos das substâncias entre estas, o monóxido de carbono, tem sido amplamente estudada nos últimos anos, sendo reportadas variações tanto do ponto de vista da toxicocinética (capacidade de difusão pulmonar ao CO e ventilação pulmonar) como da toxicodinâmica (concentração de hemoglobina e ciclo sono-vigília)^{37,117,154,184,185,192}.

2.6. População susceptível

A população considerada susceptível aos efeitos do monóxido de carbono pode ser dividida em dois grupos. O primeiro grupo, caracterizado pela susceptibilidade individual, tem capacidade diminuída de transporte de O_2 ou elevada ventilação pulmonar e o segundo grupo é identificado pela exposição ao CO em altitudes elevadas⁶⁵.

Os efeitos do CO e a hipoxia induzida pela altitude são similares. A diminuição da pressão parcial de O_2 no ar ambiente e o aumento de COHb no sangue produzem efeitos fisiológicos por mecanismos diferentes, com relação à pO_2 sangüínea, à afinidade da Hb pelo O_2 e ao grau de saturação da hemoglobina. A hipóxia provocada pelo CO desloca a curva de dissociação da oxiemoglobina para a esquerda, enquanto a diminuição da pO_2 do ar ambiente desloca-a para a direita^{104,137}.

A atividade física em altitudes elevadas requer acentuada ventilação pulmonar, o que favorece a absorção e a subsequente eliminação de CO. No entanto, a retenção de CO é favorecida pela menor pressão parcial de oxigênio no ar ambiente. As populações que vivem em tais altitudes, além de mais susceptíveis aos efeitos do CO, estão sujeitas a maior exposição ocasionada pela combustão incompleta da matéria carbonada em atmosfera rarefeita.

Os portadores de doença cardiovascular ou respiratória, anêmicos ou portadores de hemoglobinopatias, hipertireodismo, gestantes, fetos, crianças e idosos constituem grupos de indivíduos susceptíveis ao CO^{102,191}.

Pacientes com doenças cardiovasculares e/ou respiratórias, segmento significativo da população em geral e de grande importância na exposição ocupacional, apresentam deficiência de oxigenação dos tecidos devida à própria doença e à ineficiência dos mecanismos de compensação, com o aumento de fluxo sangüíneo^{11,191}.

O indivíduo anêmico tem, além do prejuízo inicial no transporte de O_2 , maior porcentagem de COHb em relação ao não anêmico, para a mesma pressão de CO no ar ambiente.

As crianças e as gestantes constituem também grupos susceptíveis, principalmente à exposição aguda ao CO, por terem uma ventilação pulmonar aumentada. Adicionalmente, as gestantes têm produção endógena do CO maior e uma tendência à anemia¹³⁷.

A velocidade de absorção e eliminação do CO pelo feto é equivalente a 1/3 da do adulto⁵. Na exposição a curto prazo a concentração máxima de COHb é menor no feto que na mãe, mas por outro lado, é mantida por tempo maior. Os efeitos tóxicos observados no feto são acentuados pela baixa pO_2 arterial e por não

existir, na circulação fetal, mecanismos de compensação¹³⁷.

2.7. Monitorização biológica

A monitorização biológica é definida como " a avaliação sistemática e periódica do toxicante ou de seus produtos de biotransformação em material biológico, para estimar a exposição e o risco à saúde do indivíduo, por comparação dos resultados com um valor de referência apropriado" ²¹³

É necessário o conhecimento da toxicocinética e/ou da toxicodinâmica do xenobiótico para se determinar o indicador biológico apropriado à avaliação do risco da exposição^{87,109}. Uma vez estabelecido o IB, a monitorização é condicionada à facilidade de se obter e conservar o material biológico em que se encontra o indicador, ao conhecimento dos fatores que interferem na interpretação dos resultados, à disponibilidade de método de análise, exato, preciso e sensível e à existência de padrões de segurança (Limites biológicos de exposição)¹²⁹.

2.7.1. Indicadores biológicos e seus limites

O indicador biológico da exposição ao monóxido de carbono mais utilizado é a carboxiemoglobina no sangue^{16,32}. Este parâmetro constitui excelente indicador, tanto de dose interna quanto de efeito. Como indicador de dose interna reflete a absorção e a quantidade do xenobiótico ligado ao seu principal sítio de ação e exposição recente¹⁸.

Outro indicador biológico é o monóxido de carbono no sangue. Visto que a quantidade de CO dissolvida no sangue representa uma fração desprezível, em relação à quantidade ligada à hemoglobina, a porcentagem de COHb pode ser estimada indiretamente, pela medida do CO.

A determinação da concentração de CO no ar expirado (ar alveolar), não é muito usada devido às dificuldades da colheita da amostra e outras desvantagens relacionadas à metodologia analítica, que serão descritas no item 2.7.2. . O monóxido de carbono no ar exalado não deve ser usado como indicador biológico de exposição em indivíduos com doenças pulmonares crônicas.

Para interpretar os resultados obtidos na monitorização biológica da

exposição ao CO é necessário o conhecimento dos valores encontrados em indivíduos não expostos a esse gás. Abaixo, são mostrados estes níveis em algumas situações^{5,105,147,181}:

% de COHb	CO no ar exalado (ppm)	observações
produção endógena		
0,4 - 0,7	< 2	
4 - 6	30	anemia hemolítica
exposição :		
à fumaça de cigarro		
5 - 6	30 - 35	um maço por dia
7 - 9	45 - 50	dois a três maços por dia
em áreas urbanas		
>5	30	concentração de CO no ar ambiente de 25 ppm (em inversões térmicas pode chegar a 100 ppm)
ao cloreto de metileno		
3 - 5	15 - 30	concentração de 100 ppm de CH ₂ Cl ₂ no ar.

No âmbito ocupacional, em nosso país, a Portaria 3214/78 do Ministério do Trabalho fixa o limite de tolerância (LT) para o CO no ambiente de trabalho em 39 ppm (43 mg/m³), considerando a exposição de até 48 horas semanais. Este valor é baseado na concentração de CO no ar ambiente que não resulte em nível sanguíneo de carboxiemoglobina superior a 5%, sendo este considerado o Limite de Tolerância Biológico (LTB) para não-fumante. Os valores para os outros indicadores não constam na legislação brasileira.

As amostras de sangue, para a determinação dos teores de COHb ou de CO no sangue, devem ser colhidas no final da jornada de trabalho ou durante a

exposição a altas concentrações.

Não existem dados disponíveis que possam indicar um valor limite adequado à população susceptível, como em trabalhadores com atividade física exagerada, ou portadores de doenças cardiovasculares e/ou respiratórias crônicas, em gestantes e em populações localizadas em altitudes elevadas. Desta forma, aconselha-se a manutenção da vigilância médica paralelamente à monitorização da exposição.

O limite biológico de exposição ao CO no ar alveolar, recomendado pela ACGIH, é de 40 ppm^{5,95}. Para refletir a exposição ao CO, as amostras devem ser colhidas no final da jornada de trabalho e não antes de 3 horas após o início desta ou até 10 minutos após o final da jornada de trabalho.

A monitorização biológica fornece resultados complementares à monitorização ambiental, esta última auxilia na avaliação da exposição e envolve estratégias de amostragem que devem ser criteriosamente estabelecidas para que os resultados sejam significativos e possam ser comparados aos padrões de segurança 10,28,34,63,91,145,152,155. Os limites máximos permissíveis de CO no ar e os limites biológicos de exposição são mostrados nos **anexos III e IV**.

2.7.2. Metodologia analítica

A disponibilidade de metodologia analítica adequada à quantificação de determinado indicador biológico é condição importante na monitorização biológica¹⁰⁸. A escolha do método deve ser fundamentada nos parâmetros de especificidade, precisão, exatidão, sensibilidade, praticabilidade, tempo de execução e custo.

A técnica de colheita da amostra tem papel importante, e quando não executada adequadamente, pode invalidar um resultado analiticamente exato⁴.

A colheita do ar exalado requer técnica complexa e não é tão bem definida como a colheita da amostra de sangue. A porção de ar amostrado bem como a ventilação pulmonar do indivíduo modificam significativamente os resultados obtidos. Por isso alguns autores sugerem a análise simultânea de alguns parâmetros que sejam indicadores da taxa de respiração, como por exemplo, o CO₂

Pelo fato do ar na via respiratória não ser homogêneo na sua composição, a técnica mais comum envolve a colheita de ar alveolar de indivíduo em repouso, com frequência respiratória normal. Para tal, o indivíduo deve, após uma inspiração total, manter-se em apnéia durante 20 segundos e, em seguida, proceder uma prolongada e ininterrupta expiração. A porção final desta expiração forçada, cerca de 200 mL, corresponde ao ar alveolar^{61,70,112,120}.

Os tipos de coletores variam desde sacos plásticos especiais a cateter nasofaríngeo. Outros, como tubos de vidro, tubos com seringas acopladas (tubo de Haldane-Priestley), tubos de alumínio e máscaras faciais são descritos por vários autores, sendo quase que específicos a cada um^{84,169,197,211}.

As dificuldades na colheita da amostra do ar exalado juntamente com o custo elevado e a complexidade dos amostradores dificultam seu emprego em análises de rotina. Além disso, são requeridas técnicas de quantificação muito sensíveis visto os baixos teores de CO neste tipo de amostra.

A concentração de CO seja no ar alveolar, no ar ambiente ou no sangue é determinada, praticamente, com as mesmas técnicas de identificação, sendo de uso mais comum: a espectroscopia de absorção de infravermelho não dispersiva (IRND) na análise contínua de CO no ar ambiente; a cromatografia gasosa com detectores de ionização de chama ou de condutividade térmica na análise instantânea do gás no ar ambiente, no ar alveolar ou liberado da COHb²⁶; a colorimetria, técnica semiquantitativa, na determinação instantânea no ar ambiente com o uso de tubos indicadores^{59,64,122}.

A colheita de sangue apresenta a desvantagem de ser processo invasivo e requerer pessoas qualificadas para executá-la. Na determinação da carboxiemoglobinemia a amostra pode ser de sangue venoso ou arterial e deve ser colhida em recipiente fechado contendo anticoagulante (heparina ou o sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético) sendo o mais usado os tubos para colheita a vácuo^{14,29,33,41,43,150,168}.

A carboxiemoglobinemia pode ser determinada diretamente por métodos espectrofotométricos^{20,29,53,118,142,158}, ou indiretamente, pela quantificação do CO liberado da COHb^{38,41,49,92,133}.

A **tabela IV** reúne os principais métodos de análise de COHb no sangue. O seu número é restrito devido à escassez de trabalhos de desenvolvimento e padronização. A maioria compara os resultados obtidos por dois ou mais métodos, previamente descritos, ou aplica a metodologia a determinados grupos de indivíduos expostos ao monóxido de carbono.

Os métodos espectrofotométricos diferem entre si nas faixas de comprimento de onda de leitura das absorvâncias, no número de derivados hemoglobínicos quantificados e, principalmente, no processo de quantificação. Este tem por base o quociente das absorções em determinados comprimentos de onda ou o espectro de absorção diferencial, ou ainda, o espectro derivativo.

Os métodos que envolvem a relação das absorções máxima e mínimas dos pares carboxiemoglobina e oxiemoglobina ou carboxiemoglobina e hemoglobina reduzida são os mais comuns^{20,56,99,103,150}.

RODKEY *et al.*¹⁵⁸ propuseram um método com base na comparação dos espectros de Hb reduzida (Hb^{red}) e de COHb. A redução das hemoglobinas para a obtenção do sistema bicomponente, é obtida pelo uso do hidrossulfito de sódio (ditionito), e a absorvância determinada em 420 e 432 nm. As razões das absorvâncias nestes comprimentos de onda são particularmente sensíveis à quantidade de COHb presente na amostra. A porcentagem de COHb é calculada correlacionando-se as absorvâncias da amostra com os coeficientes de absorvidade molar da Hb^{red} e da COHb nos comprimentos de onda apropriados. O método é trabalhoso em termos de cálculos matemáticos, mas os resultados são exatos e reprodutíveis¹⁵⁸.

WIGFIED *et al.*²⁰⁷ reproduziram o método de RODKEY *et al.* considerando-o de escolha frente a outros por eles estudados. BEUTLER & WEST²⁰ introduziram modificações que permitiram a exposição da amostra ao ar, o que tornou a técnica mais prática.

O segundo processo de quantificação nos métodos espectrofotométricos é o da obtenção de espectro diferencial, desenvolvido por vários autores^{29,43,66,186}. O método descrito por COMMINS & LAWOTHER⁴³ em 1965, revalidado por LILY¹¹⁵ em 1972, tem a vantagem de utilizar somente 0,01 mL de sangue que pode ser obtido por punção digital. A concentração de COHb é calculada pela diferença de dois espectros de absorção na faixa de comprimento de onda de 415 a 430 nm. A **figura 9** mostra os espectros de absorção das soluções de oxiemoglobina e carboxiemoglobina e o espectro diferencial.

Tabela IV - Principais métodos para determinação da carboxiemoglobinemia

método	sangue (mL)	tempo de análise (min)	resolução (ml/dL)	CV(COHb) (%)	referência
ESPECTROFOTOMÉTRICO					
espectro de absorção	0,003	10	-	0,6 (101,8) 6,5 (6,99) 119,0 (0,26)	RODKEY et al. (1974) ¹⁵⁸
	0,025	10	-	0,97 (7,23) 9,4 (1,28)	BEUTLER & WEST (1984) ²⁰
espectro diferencial	0,01	20	-	10,6 (0,7) 2,2 (5,0) 1,9 (20,3) 4,0 (33,8)	COMMINS & LAWTHORP (1965) ⁴³
CO - oxímetro	0,03	25	-	-	BUCHWALD (1969) ²⁹
	0,40	3	-	-	MAAS (1970)
	0,30	3	-	-	DENNIS & VALERI (1980) ⁵³
espectro derivativo	0,10	7	-	2,9 (15)	SANDERSON (1978) ¹⁶⁸
	0,01	15	-	3,3 (50)	PARKS & WORTH (1985) ¹⁴⁰
GASOMÉTRICO					
	1,0	15	0,03	6	HARVATH & ROUGHTON (1942)
	0,5	30	0,02	2 a 4	ROUGHTON & ROOT (1945)
CROMATOGRÁFICO					
condutividade térmica	0,25	3	0,006	1,5 (1,30) 5,1 (0,13)	DAHMS & HORWATH (1974) ⁴⁹
	1,5	10	-	-	HESSEL & MODGLIN (1967) ⁹²
	1,0	30	0,001	2,0	AYRES (1966)
	1,0	20	0,005	1,8	McCREDIE (1967)
ionização de chama	0,1	20	0,002	1,8	COLLISON et al. (1968) ⁴¹
	2,0	30	0,06	1,8	COBURN et al. (1964) ³⁸

adaptado de DAHMS & HORVATH⁴⁹

Figura 9 - Espectro de absorção das soluções de oxiemoglobina, carboxiemoglobina e o espectro diferencial⁴¹.

COMMINS & LAWThER obtiveram boa correlação ($r = 0,94$) entre os valores de COHb esperados e os encontrados. WIGFIELD *et al.*²⁰⁷, estudando este método, relataram não obter a mesma linearidade reportada pelos autores, detectando valores elevados para baixas % de COHb, valores baixos para as altas concentrações e valores equivalentes para teores médios de COHb.

Este método foi mais tarde simplificado por BUCHWALD²⁹(1969). FENTON⁶⁶(1972) aponta que falsos resultados podem ser encontrados pela presença de traços de detergente, levando a erros de até 200% .

Os métodos chamados *multicomponentes* usam a técnica diferencial e permitem a determinação simultânea da concentração de vários derivados hemoglobínicos, incluindo hemoglobina reduzida, oxiemoglobina, carboxiemoglobina e metaemoglobina^{78,201,215}.

Esta técnica, automatizada, é encontrada no aparelho CO-oxímetro, usado por vários autores^{45,53,200,214}, principalmente, em estudos com grande número de amostras. O aparelho determina simultaneamente a hemoglobina, oxiemoglobina e metaemoglobina e requer apenas 300 μL de sangue. O conteúdo total de O_2 é também fornecido pelo aparelho. A leitura das absorvâncias é feita em quatro comprimentos de onda 535,0, 585,2, 594,5 e 626,6 nm, à temperatura controlada de 37°C. A **figura 10** mostra a disposição eletrônica e mecânica do aparelho⁵³.

Figura 10 - Esquema simplificado do CO-oxímetro (IL-282), usado na determinação da carboxiemoglobinemia⁵³.

Esse tipo de análise segue a lei de *Lambert-Beer*. Se os componentes da mistura não interagirem, a solução que contenha n componentes, com espectros de absorção suficientemente diferentes, pode ser analisada pela medida da absorvância em pelo menos n comprimentos de onda. A concentração de cada componente da mistura pode ser determinada se a absorvidade molar de cada um for conhecida⁷⁷.

Apesar de prático, o CO-oxímetro apresenta algumas desvantagens. BARETA *et al.*¹⁴, relatam que um problema freqüentemente encontrado é a dificuldade do ajuste do zero entre as leituras, por deficiência no processo de limpeza automática da câmara da amostra. A presença da hemoglobina fetal, nesta técnica, pode hiperestimar os resultados da % de COHb²¹⁴.

Nos últimos anos, tem sido desenvolvida a técnica de derivação matemática dos espectros de absorção com o objetivo de evidenciar a absorção

mínima de determinado componente presente em misturas com absorção de fundo elevada, aumentando a seletividade da técnica. Atualmente são disponíveis espectrofotômetros que permitem obter até a quarta derivada do espectro de absorção, automaticamente.

Os procedimentos com derivação dos espectros de absorção foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a seletividade dos métodos espectrofotométricos^{121,124,140,168,188}.

A primeira derivada pode eliminar ou minorar a contribuição da absorvância de fundo que não varie com o comprimento de onda. Adicionalmente, a 2ª derivada tem a vantagem de diminuir ou eliminar a influência das substâncias com espectros de absorção que variam com o comprimento de onda, cujas curvaturas são pequenas quando comparadas às dos espectros de interesse. Em outras palavras, um componente com um pico de absorção achatado¹²⁴.

PERRIGO & YOYNT¹⁴² estudaram vários métodos que usam a técnica de derivação na medida espectrofotométrica da COHb na região Soret (380 a 450 nm), comparando-os com os sem derivação e encontraram excelente correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Entretanto não relataram vantagem no uso do espectro derivativo, ressaltando que a possibilidade teórica de se ter um resultado mais exato por esta técnica não é evidente no caso da determinação da COHb, porque depende do tipo da absorção característica da substância a ser quantificada. A **figura 11** mostra os espectros de absorção e os derivados obtidos por PERRIGO & YOYNT para as soluções de 0, 50 e 100% de COHb.

Os métodos até aqui descritos constituem os de determinação direta da carboxiemoglobina.

Outros métodos existem em que a carboxiemoglobinemia é determinada indiretamente através da quantificação do CO liberado da COHb, o que torna necessário o conhecimento do conteúdo hemoglobínico da amostra^{16,17}. Nos métodos indiretos predomina a técnica de cromatografia gasosa com detectores de condutividade térmica, ionização de chama e infravermelho; são também usadas a espectrofotometria na faixa do infravermelho. Todas elas utilizam um agente liberador de CO que varia segundo o autor (tabela V).

Figura 11 - Espectros de absorção normal e as derivadas de 1ª, 2ª e 4ª ordem da carboxiemoglobina (COHb) em concentrações de 0% (—), 50% (+ + +) e 100% (...)¹⁴².

A técnica de identificação colorimétrica do CO liberado do sangue é uma das mais antigas. O gás liberado da COHb pelo ácido sulfúrico na célula de microdifusão (câmara de Conway), reduz o cloreto de paládio com a formação de íons H^+ ^{116,129,210}.

A quantificação pode ser feita por titulação dos íons H^+ , determinação colorimétrica do $PdCl_2$ residual ou espectrofotométrica após a adição de solução neutra de iodeto de potássio¹¹⁶.

Nas técnicas cromatográficas em fase gasosa, o monóxido de carbono e outros gases liberados são conduzidos por um gás de arraste através do

Tabela V - Reagentes usados na liberação do monóxido de Carbono da hemoglobina e as técnicas para identificá-lo²³.

técnica de identificação	reagente	autor
colorimétrica	ácido sulfúrico	BERKA
	ácido sulfúrico	CONWAY
	ácido sulfúrico	GRAY & SANDIFORD
	ácido sulfúrico (10%)	NOBEL & RIKER
gasométrica	ferricianeto de potássio bicarbonato de potássio saponina	SCHOLANDER & ROUGHTON
	ferricianeto de potássio ácido láctico saponina	SENDROY & LIU
	ferricianeto de potássio tampão acetato (4:1).	ROUGHTON & ROOT
espectrofotométrica	ferricianeto de potássio tampão acetato (pH-6,0) (3:1)	COBURN <i>et al.</i>
cromatográfica	ácido láctico, ácido clorídrico, água (2:1:1).	AINSWORTH <i>et al.</i>
	ferricianeto de potássio.	COLLISON <i>et al.</i>
	ferricianeto de potássio, ácido láctico.	McCREDIE <i>et al.</i>
	ferricianeto de potássio, tampão bicarbonato (pH=9,5), saponina.	BLACKMORE

cromatógrafo e a separação dos gases é geralmente feita por colunas de peneira molecular (pedras de polímero poroso).

Apesar do detector de ionização de chama (DIC) não apresentar resposta ao CO, seu uso foi proposto por RUSSEV¹⁶⁷ para a análise de gases inorgânicos, em condições especiais. Os métodos que utilizam o DIC^{41,58,67,79,148,157,167,171,186,199,209} em geral necessitam de modificações, como a inserção de unidade catalítica entre a coluna de separação e o detector (figura 12).

Figura 12 - Esquema do sistema cromatográfico para análise de CO após a conversão de CO liberado da carboxiemoglobina a CH_4 e usando um detector de ionização de chama.

Para tornar o DIC mais eficaz na determinação, propõe-se adicionar, continuamente, pequenas quantidades de hidrocarboneto à chama para aumentar a intensidade da corrente de fundo, permitindo o aparecimento de um sinal inverso ou negativo na passagem do CO ¹⁷¹. Outro recurso, muito empregado, é converter o CO a metano pela passagem de H_2 em catalisador de níquel, anteposto ao DIC; o sinal resultante é positivo.

O detector de condutividade térmica (DCT, Katarômetro) é o mais freqüentemente usado e os limites de detecção, para gases inorgânicos, variam consideravelmente com o tipo de célula^{33,49,75,92,93,133,165,167}.

STEHER *et al*¹⁸⁰ adaptaram um detector eletroquímico para o CO ligado (em série) a um detector de condutividade térmica o detector eletroquímico

é usado no aparelho portátil *Ecolyser*. O detector eletroquímico é composto por um eletrodo catalítico de platina que converte CO em CO₂. A corrente gerada pela reação é diretamente proporcional à concentração de CO presente na amostra.

Em geral, as técnicas cromatográficas têm-se mostrado exatas na determinação da carboxiemoglobinemia. Entretanto, são demoradas e trabalhosas na etapa de liberação do gás do sangue e de sua introdução no sistema cromatográfico⁴⁹.

DIJKHUIZEN *et al.*⁵⁶ usaram a titulometria para a determinação do CO no sangue. O CO ligado à hemoglobina é liberado e oxidado a CO₂ em forno contendo CuO a 400 °C. O gás é recolhido em solução alcoólica de cloreto de bário e, subseqüentemente, titulado com solução de hidróxido de sódio.

A preparação do padrão de COHb sangue (método direto) e de CO em ar (método indireto) é etapa importante que reflete diretamente na exatidão do método.

SUNDSTROM¹⁸⁶ cita 3 maneiras diferentes de preparação da solução com 100 % de COHb. O primeiro, pelo estabelecimento do equilíbrio entre sangue total e 1 % de volume de CO em tonômetro. O segundo, pela mistura de solução de hemoglobina com 1% de volume de CO em N₂ numa seringa; a baixa pressão parcial do CO resulta em pequena quantidade de gás dissolvido. A terceira, pela mistura da solução de hemoglobina e CO puro numa seringa, seguido pela lavagem com N₂.

BEUTLER & WEST²⁰ recomendam a preparação dos padrões de 100% COHb e 100% O₂Hb pelo borbulhamento dos gases puros CO e O₂ em sangue diluído. SUNDSTROM¹⁸⁶ mostra a importância dos cuidados a serem tomados para evitar a presença de CO dissolvido, na solução e a de derivados hemoglobínicos que não se ligam ao CO, como a sulfaemoglobina e a metaemoglobina. Nestes casos a determinação de COHb, baseada na relação entre CO liberado e a concentração de hemoglobina total, forneceria resultados errôneos. Esta relação é feita pelo fator teórico de que um grama de hemoglobina pode se ligar a 1,39 mL de CO.

Resumidamente pode-se concluir que os métodos espectrofotométricos apresentam a vantagem de requerer pequeno volume de amostra, pouco tempo de análise e não necessitar de modificações nos aparelhos e a desvantagem da interferência de substâncias presentes na amostra que tenham espectros de absorção semelhantes, ou seja, menor especificidade. Apresentam precisão semelhante aos métodos cromatográficos, mas menor sensibilidade. Os métodos cromatográficos, apesar da maior sensibilidade, são limitados pela desvantagem da pré-reação de liberação de CO da COHb presente no sangue, da necessidade de quantificação, em paralelo, de Hb total e da necessidade de modificações nos cromatógrafos para conversão de CO em CH_4 , uma vez que a sensibilidade do detector de ionização de chama é mínima para gases inorgânicos.

3. OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho é de otimizar um método analítico adequado à determinação da carboxiemoglobina no sangue, para uso rotineiro em monitorização biológica da exposição ocupacional ao monóxido de carbono. Para atender esta finalidade o método deve ser sensível, preciso, exato e simples.

O plano de trabalho consta das seguintes etapas:

- revisão bibliográfica de métodos analíticos para a determinação da carboxiemoglobinemia;
- seleção e otimização de método analítico adequado à monitorização biológica da exposição ocupacional ao monóxido de carbono;
- estudo da interferência de constituintes da matriz biológica na quantificação da carboxiemoglobina pelo método estudado;
- aplicação do método otimizado à determinação da carboxiemoglobina em amostras de sangue de indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono, fumantes e não fumantes;
- análise estatística dos resultados obtidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Otimização da determinação espectrofotométrica da carboxiemoglobina

4.1.1. Material

4.1.1.1. Amostras

As amostras de sangue usadas para a otimização do método foram obtidas de indivíduos não-fumantes não-expostos ocupacionalmente ao CO. Utilizaram-se tubos Vacutainer^R contendo heparina sódica para a colheita. As amostras foram armazenadas sob refrigeração de 4 a 8 °C.

4.1.1.2. Aparelhos e acessórios

- espectrofotômetro *Beckman*, modelo DU-70, monofeixe;
- espectrofotômetro *Intralab*, modelo DMS-80, duplo feixe;
- impressora *Beckman*;
- cilindros de gás comprimido de oxigênio medicinal, de monóxido de carbono (grau de pureza 99,99%) e de nitrogênio R do *Oxigênio do Brasil S.A.*;
- tubos *Vacutainer* contendo heparina sódica (143 unidades para 7 mL de sangue);
- pipetas automáticas *Eppendorf* de 100 e 200 µL;
- repipetadores automáticos *Dispenser LN* de 10 e 20 mL da *Labnew*.

4.1.1.3. Reagentes

- tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), 0,1 M, pH=6,85. Esta solução é estável quando conservada em recipiente plástico à temperatura de 4 a 8 °C;
- ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$);
- formiato de sódio;
- ácido sulfúrico concentrado;
- solução hemolisante: diluir o tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) de 1:10 com água desionizada. Preparar semanalmente e conservar em recipiente plástico, entre 4 e 8 °C;

- solução redutora: adicionar 25mg de ditionito de sódio a 20 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$. Preparar imediatamente antes de usar.

Todos os reagentes usados foram de grau p.a., da *Merck*.

As soluções foram preparadas com água destilada e desionizada.

4.1.2. Métodos

4.1.2.1. Procedimento analítico

Foi utilizado o método de BEUTLER & WEST (1984)²⁰ sem modificações:

- adicionar 100 μL de sangue a 12,0 mL de solução hemolisante, em tubo de ensaio (100 X 13 mm);
- tampar o tubo e homogeneizar, por inversão, 2 a 3 vezes;
- deixar em repouso por 10 minutos;
- pipetar 200 μL desta solução para tubo de ensaio (77 X 10 mm) contendo 2,3 mL de solução redutora;
- tampar o tubo e homogeneizar, por inversão, 2 a 3 vezes;
- deixar em repouso por 10 minutos;
- ler as absorvâncias em 420 e 432 nm, usando a solução redutora como referência.

O esquema da seqüência analítica é mostrado na **figura 13**.

Figura 13 - Esquema da seqüência analítica usada na determinação da concentração de carboxiemoglobina.

A concentração da carboxiemoglobina é obtida através da equação:

$$\%COHb = \frac{1 - (AR \times F_1)}{AR (F_2 - F_1) - F_3 + 1} \times 100$$

onde, **AR** é a razão entre as absorvâncias da solução em 420 e 432 nm; **F₁**, **F₂** e **F₃** representam as razões entre duas absorvidades molares ou, simplificadaamente, a razão das absorvâncias das soluções com 100% de hemoglobina reduzida e 100% de carboxiemoglobina, em 420 e 432 nm. Estes fatores podem ser determinados para cada aparelho e os valores calculados pelas absorvidades molares de referência são^{20,158}:

$$F_1 = \frac{A_{432}^{Hbred}}{A_{420}^{Hbred}} = 1,3330$$

$$F_2 = \frac{A_{432}^{\text{COHb}}}{A_{420}^{\text{Hbred}}} = 0,4787$$

$$F_3 = \frac{A_{420}^{\text{COHb}}}{A_{420}^{\text{Hbred}}} = 1,9939$$

4.1.2.2. Determinação dos fatores de calibração do espectrofotômetro

- adicionar 500 μL de sangue a 60 mL de solução hemolisante; pipetar 3 mL desta solução em 16 tubos de ensaio (100 X 13 mm);
- nos primeiros 10 tubos borbular CO proveniente de cilindro de gás por 3 minutos usando um borbulator*, com agitação frequente da solução; tampar os tubos imediatamente após o borbilhamento;
- nos 6 tubos restantes borbular O_2 por 15 minutos por meio de um borbulator; tampar os tubos imediatamente após o borbilhamento;
- submeter as soluções com 100% de COHb e 100% de O_2Hb à corrente de N_2 por 2,5 minutos, usando o borbulator; tampar os tubos imediatamente após o borbilhamento;
- transferir exatamente 2,0 mL de cada solução para balões volumétricos de 25 mL; completar o volume com solução redutora, tampar e homogeneizar;
- ler as absorvâncias em 420 e 432 nm imediatamente após a diluição para as soluções com 100% de COHb e após 10 minutos, para as soluções com 100% de Hb^{red} ;
- calcular os fatores F_1 , F_2 , F_3 segundo as fórmulas descritas no item 4.1.2.1.

Os tempos de borbilhamento dos gases para a preparação das soluções saturadas devem ser padronizados.

- Preparação das soluções de carboxiemoglobina e de hemoglobina reduzida.

Para determinar o tempo de borbilhamento de CO e O_2 adequado à preparação da solução com 100% de COHb e 100% de Hb^{red} foram diluídos 500 μL

* Tubo de vidro (110 x 5 mm) com placa de vidro poroso numa extremidade, com o qual se obteve o fluxo de 50 mL/min de O_2 e do CO e de 30 mL/min de N_2

de sangue em 60 mL de solução hemolisante.

Alíquotas de 3,0 mL do hemolisado foram submetidas à corrente de monóxido de carbono, proveniente de cilindro de gás comprimido, durante os tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 minutos; para a saturação com o O₂, os tempos de borbulhamento foram de 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos.

A seguir, foi passada corrente de N₂ por 2,5 minutos em todas as alíquotas e 2,0 mL de cada uma foram diluídos, a 25,0 mL com solução redutora em balão volumétrico.

As leituras das absorvâncias das soluções de COHb foram feitas imediatamente após a diluição, enquanto das soluções de Hb^{red} foram feitas 10 minutos após a diluição.

Os ensaios, para cada tempo estudado, foram realizados em triplicata para as soluções de COHb e em duplicata para as de O₂Hb.

- Uso do monóxido de carbono obtido por reação química na preparação da solução de carboxiemoglobina.

Por via química, o CO pode ser obtido pelo tratamento de formiato de sódio com ácido sulfúrico. Num funil de separação de 125 mL, colocar 25 mL de H₂SO₄ e adaptá-lo a um kitassato de 125 mL contendo 20g de formiato de sódio e pérolas de vidro. O monóxido de carbono formado deixa o sistema pela saída lateral do kitassato, ligada a um tubo de borracha com uma pipeta Pasteur na extremidade. Esta deve tocar o fundo de um tubo de ensaio (100 x 13 mm) contendo 3 mL do hemolisado. (**figura 14**).

Para determinar o tempo de borbulhamento de CO adequado à preparação da solução com 100% de COHb, foram preparados cinco hemolisados de 24 mL, dividindo-se cada um em alíquotas de 3,0 mL (5 séries). Para cada reação de geração de CO, as alíquotas de uma série foram submetidas sequencialmente ao borbulhamento durante tempos diferentes. A soma dos tempos de borbulhamento nas alíquotas de uma série corresponde ao tempo de geração contínua de CO de uma reação.

As concentrações de COHb obtidas em cada alíquota, após o borbulhamento, foram determinadas em duplicata.

Figura 14 - Esquema do sistema para produção de monóxido de carbono.

A série de tempos de borbulhamento para cada reação foi:

- série A - 5, 10, 15, 20, 30 e 30 min;
- série B - 10, 10 e 15 min;
- série C - 20, 20 e 30 min;
- série D - 10, 15, 15, 15, 15 e 30 min;
- série E - 10, 30 e 15 min.

- Deslocamento de monóxido de carbono dissolvido em solução

Várias alíquotas do hemolisado com 100% de COHb foram submetidas à passagem de corrente de nitrogênio, em diferentes tempos, para verificar qual seria o adequado ao deslocamento do CO dissolvido em solução. Os tempos de borbulhamento estudados foram de 0,5 - 1,0 - 2,0 - 2,5 e 3,0 minutos.

As leituras das absorvâncias das soluções antes e após o borbulhamento de N_2 , foram efetuadas para averiguar a real concentração da solução com 100% de COHb.

Em seguida, estas soluções foram diluídas para obter-se 50% de COHb usando o hemolisado com 100% de O_2Hb , previamente submetido à passagem de corrente de N_2 por 2,5 minutos.

A preparação das soluções contendo 50% de COHb foi feita pela adição de 100 μL do hemolisado com 100% de O_2Hb a 2,3 mL da solução redutora e, após 10 minutos, a adição de 100 μL do hemolisado com 100% de COHb, fazendo-se, imediatamente, as leituras das absorvâncias.

4.1.2.3. Linearidade da técnica de quantificação

Para verificar a linearidade da resposta e o paralelismo entre as concentrações esperadas e as encontradas de COHb foram feitas misturas das soluções com 100% de COHb e 100% de Hb^{red} de modo a obterem-se concentrações na faixa de 0 a 100% de COHb (tabela VI). Para este estudo foram preparadas 3 séries, sendo que concentração foi preparada em duplicata.

As absorvâncias das soluções foram lidas em 420 e 432 nm, obtendo-se os respectivos valores de AR, com os quais foram calculadas as concentrações de COHb.

Tabela VI - Volume das soluções reduzidas de carboxiemoglobina (COHb) e hemoglobina reduzida (Hb^{red}) usados na preparação das diferentes concentrações de COHb.

% COHb esperada	solução (mL)	
	100% Hb ^{red}	100% COHb
0	5,00	0,00
1	4,95	0,05
2	4,90	0,10
4	4,80	0,20
6	4,70	0,30
8	4,60	0,40
10	4,50	0,50
14	4,30	0,70
20	4,00	1,00
40	3,00	2,00
50	2,50	2,50
60	2,00	3,00
100	0,00	5,00

4.1.2.4. Precisão do método

O estudo da precisão intra-série foi efetuado pela análise de 6 amostras autênticas de diferentes concentrações de carboxiemoglobina. Cada amostra foi analisada 9 vezes em média.

Para avaliar, isoladamente, a influência das etapas de diluição na precisão do método foram preparados 10 hemolisados de sangue de indivíduo fumante, e a diluição seguinte, de um destes hemolisados, foi repetida 14 vezes.

Para estudar a influência da técnica de pipetagem foi comparado o uso de pipeta automática e repipetador ao uso de pipeta comum. A determinação da carboxiemoglobinemia foi feita em um indivíduo fumante e um não-fumante, usando-se as duas técnicas. Foram feitas em média, 11 determinações de cada amostra.

A determinação do valor mínimo confiável foi fundamentada nos coeficientes de variação obtidos em concentrações decrescentes de COHb.

4.1.2.5. Estabilidade das leituras de absorvância

Para este estudo foram preparadas concentrações de 0 , 2 , 5 , 10 , 15 , 25 , 50 e 100% de COHb, de maneira similar à descrita no item 4.1.2.3.

As soluções finais, para a leitura das absorvâncias foram mantidas à temperatura ambiente em cubetas abertas e as absorvâncias lidas de 10 em 10 minutos, perfazendo o tempo de 90 minutos.

4.1.2.6. Estabilidade da carboxiemoglobinemia nas amostras

A estabilidade da COHb nas amostras de sangue foi estudada determinando-se sua concentração, até oito dias após a colheita, em 3 amostras de sangue de indivíduo não-fumante e em 5 de fumante. De cada doador foram colhidas no mesmo ato, em seqüência, 3 amostras (a, b, c), das quais a primeira (a) foi analisada, dia após dia, até o 8º dia; a segunda (b) foi mantida em vácuo até o 3º dia, para a partir de então ser analisada diariamente; a terceira (c) foi conservada em vácuo até o 8º dia, quando todas as amostras foram analisadas.

4.1.3. Influência da matriz biológica

4.1.3.1. Conteúdo hemoglobínico

A influência do conteúdo hemoglobínico na determinação da % de COHb foi estudada de duas maneiras:

- pela determinação da % COHb em amostras preparadas com valores de hemoglobina total variáveis. Para tanto uma amostra de sangue foi dividida em 5 alíquotas de 2,0 mL (A a E) às quais foram adicionados ou retirados volumes diferentes de plasma de maneira a se obterem, respectivamente, valores menores e maiores de hemoglobina total. Em cada alíquota, além da % de COHb, foram determinadas as concentrações de hemoglobina total e o valor do hematócrito, pelo método da cianometaemoglobina ³⁵ e de microematócrito ^{48,183} respectivamente;
- pela determinação da % COHb em 3 amostras de sangue após diluições em diferentes proporções com a solução hemolisante. Para se obterem soluções de sangue hemolisado com teores de hemoglobina variáveis, 100 μ L de cada amostra foram diluídos em volumes variáveis - 8,0 - 10,0 - 12,0 - 14,0 - 16,0 - 18,0 e 20,0 mL - de solução hemolisante. Desta forma, para cada amostra, foram obtidas sete soluções de sangue hemolisado de conteúdo hemoglobínico diferente.

4.1.3.2. Lipemia

Para avaliar a influência do plasma lipêmico na determinação da concentração de COHb foram colhidas duas amostras de três indivíduos, sendo uma em condição de jejum e outra, uma a duas horas, após a refeição. A concentração de lipídios totais foi determinada em todas as amostras pelo método de FRINGS *et al.*⁷¹.

A determinação da % COHb das amostras colhidas em jejum foi feita também após a adição, à solução de sangue hemolisado, de 100 e 200 μ L de plasma de amostra do mesmo indivíduo colhido após a refeição.

4.2. Determinação da carboxiemoglobina em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono.

4.2.1. Material

4.2.1.1. População estudada

A determinação da carboxiemoglobina foi realizada em amostras de sangue de indivíduos expostos ocupacionalmente ao CO. As amostras foram colhidas em tubo Vacutainer^R contendo heparina sódica e armazenada sob refrigeração, de 4 a 8°C, no máximo por cinco dias após a colheita.

Os grupos e subgrupos estudados foram:

grupo controle - de indivíduos não-expostos ocupacionalmente ao CO, sendo:

não-fumantes	80 amostras
fumantes	19 amostras

grupo I - indivíduos que trabalham em fornos de fundição de minérios de metais de 3 empresas, subdivididos em:

I_a - não-fumantes	23 amostras
fumantes	34 amostras
I_b - não-fumantes	14 amostras
fumantes	7 amostras
I_c - não-fumantes	42 amostras
fumantes	30 amostras

grupo II - indivíduos que trabalham na regulagem de motores de combustão interna de veículos:

não-fumantes	30 amostras
fumantes	29 amostras

Nos grupos de indivíduos expostos ocupacionalmente ao CO, a colheita das amostras foi realizada no final da jornada de trabalho, sendo que nos subgrupos I_a e I_b foram colhidas, também, no início da jornada.

Paralelamente à colheita do sangue, foram obtidas dos trabalhadores algumas informações, necessárias à interpretação dos resultados de

carboxiemoglobulinemia, como:

- dados pessoais : nome, idade e hábito de fumar (número médio de cigarros fumados por dia e no dia até o momento da colheita da amostra, marca do cigarro)
- dados profissionais : tempo de serviço na empresa, cargo ou função atual, descrição da atividade exercida e uso de equipamento de proteção individual.

As amostras dos fumantes do grupo controle foram colhidas, aproximadamente, 6 horas após o início das atividades diárias e as dos não-fumantes em horário variável. As informações registradas foram referentes aos dados pessoais, incluindo as do hábito de fumar e do uso de medicamentos, e a exclusão de possível exposição ocupacional ao CO ou ao diclorometano. O grupo é composto por estudantes e funcionários da Universidade de São Paulo.

4.2.1.2. Aparelhos e acessórios

- espectrofotômetro *Intralab* modelo DMS 80, duplo feixe;
- tubos *Vacutainer* com heparina sódica (143 unidades para 7 mL de sangue);
- pipetas automáticas *Eppendorf* de 100 e 200 μ L;
- repipetadores automáticos *Dispenser* LN de 10 e 20 mL da *Labnew*.

4.2.1.3. Reagentes

Os reagentes usados foram os descritos no item 4.1.1.3.

4.2.2. Métodos

Foi utilizado o método descrito em 4.1.2.1. e a porcentagem de COHb calculada com os fatores de calibração determinados, periodicamente, para o espectrofotômetro usado.

5. RESULTADOS

5.1. Otimização da determinação espectrofotométrica da carboxiemoglobinemia

5.1.1. Preparação das soluções de carboxiemoglobina e de hemoglobina reduzida

As tabelas VII e VIII apresentam as concentrações de COHb obtidas, respectivamente, nas soluções de carboxiemoglobina e de hemoglobina reduzida, após os diferentes tempos de borbulhamento de CO e de O₂ provenientes de cilindros de gás comprimido.

Tabela VII - Valores de absorvâncias, respectivas razões (AR) e concentrações de carboxiemoglobina (COHb) das soluções de COHb obtidas após diferentes tempos de borbulhamento de CO proveniente de cilindro de gás comprimido. As concentrações de COHb foram calculadas pelos fatores do espectrofotômetro (a) e pelos de referência ¹⁵⁸ (b).

tempo de borbulhamento de monóxido de carbono (min)	absorvância		AR	COHb (%)	
	420 nm	432 nm		a	b
1	0,7759	0,8896	0,8722	8,79	9,35
	0,9536	0,7336	1,2999	34,73	34,82
	1,3769	0,3236	4,2549	99,88	100,93
2	1,3830	0,3240	4,2685	100,01	101,07
	1,3569	0,3179	4,2683	100,01	101,06
	1,3847	0,3249	4,2619	99,95	101,00
3	1,3934	0,3262	4,2716	100,04	101,10
	1,3916	0,3265	4,2622	99,95	101,00
	1,3758	0,3214	4,2807	100,13	101,19
4	1,3648	0,3204	4,2597	99,92	100,98
	1,3759	0,3227	4,2637	99,96	101,02
	1,3596	0,3185	4,2689	100,01	101,07
5	1,3988	0,3295	4,2452	99,78	100,83
	1,3893	0,3276	4,2408	99,74	100,78
	1,3697	0,3220	4,2537	99,87	100,92
6	1,3460	0,3167	4,1238	98,66	99,67
	1,3734	0,3225	4,2586	99,91	100,97
	1,3712	0,3226	4,2506	99,84	100,88

Tabela VIII - Valores de absorvâncias, respectivas razões (AR) e concentrações de carboxiemoglobina (COHb) das soluções de hemoglobina reduzida obtidas após diferentes tempos de borbulhamento de O₂. As concentrações de COHb foram calculadas pelos fatores do espectrofotômetro (a) e pelos de referência (b)²⁰.

tempo de borbulhamento de oxigênio (min)	absorvância		AR	COHb(%)	
	420 nm	432 nm		a	b
10	0,7172	0,9369	0,7655	0,43	1,24
	0,7370	0,9645	0,7641	0,31	1,13
15	0,7266	0,9556	0,7604	0,00	0,93
	0,7160	0,9401	0,7616	0,11	0,83
20	0,7188	0,9450	0,7606	0,02	0,84
	0,7177	0,9449	0,7596	-0,06	0,76
30	0,7195	0,9460	0,7606	0,02	0,84
	0,7142	0,9392	0,7604	0,00	0,83
45	0,7172	0,9439	0,7598	-0,05	0,78
	0,7120	0,9367	0,7601	-0,02	0,80
60	0,7206	0,9491	0,7592	-0,10	0,73
	0,7138	0,9373	0,7616	-0,11	0,93

As concentrações de COHb foram calculadas a partir dos valores das absorvâncias e suas razões, usando-se os fatores do espectrofotômetro *Intralab* e os de referência¹⁵⁸.

Os tempos de borbulhamento dos gases, suficientes para promover a formação de 100% de COHb e 100% de Hb^{red} foram de 3 e 15 minutos respectivamente.

5.1.2. Uso do monóxido de carbono obtido por reação química na preparação da solução de carboxiemoglobina

O monóxido de carbono gerado por reação química foi usado na preparação de soluções 100% de COHb.

Na **tabela IX** estão dispostas as % de COHb calculadas a partir das absorvâncias em 420 e 432 nm das soluções de COHb obtidas após diferentes séries de tempos de borbulhamento de CO.

Tabela IX - Concentrações de carboxiemoglobina (COHb), absorvâncias e respectivas razões (AR) das soluções obtidas após diferentes séries de tempos de borbulhamento de CO gerado por reação química.

série	tempo de borbulhamento de CO (min)	tempo de reação (min)	absorvância		AR	COHb
			420 nm	432 nm		
A	5	5	1,0794	0,4168	2,5897	77,49
	10	15	1,2063	0,2984	4,0426	99,60
	15	30	1,2011	0,2999	4,0050	99,19
	20	50	1,2089	0,3145	3,8439	97,35
	30	80	1,2131	0,3137	3,8671	97,62
B	10	10	1,1981	0,2770	4,3253	102,52
	10	20	1,2185	0,3060	3,9820	98,93
	15	35	1,2098	0,3034	3,9875	98,99
C	20	20	0,9081	0,4198	2,1632	67,22
	20	40	1,1706	0,2906	4,0282	99,44
	30	70	1,2484	0,3138	3,9783	98,89
D	10	10	1,2084	0,3006	4,0200	99,35
	15	25	1,1906	0,2859	4,1644	100,90
	15	40	1,2266	0,3041	4,0335	99,50
	15	55	1,2138	0,3022	4,0165	99,31
	15	70	1,2196	0,3077	3,963	98,73
	30	100	1,2271	0,3050	4,0233	99,39
E	10	10	1,2262	0,2994	4,0955	100,17
	30	40	1,2470	0,3047	4,0923	100,14
	15	55	1,2363	0,3081	4,0127	99,27

A **figura 15** mostra a variação nas concentrações de COHb obtidas nas repetições da reação química, com diferentes séries de tempos de borbulhamento (A a E).

O tempo necessário à saturação da solução de COHb foi de 15 minutos, excluindo-se os primeiros 5 minutos da produção do gás.

Figura 15 - Relação entre carboxiemoglobina e tempo de reação após diferentes séries de tempos de borbulhamento (séries A a E)

5.1.3. Deslocamento do monóxido de carbono dissolvido em solução

Na **tabela X** encontram-se as concentrações de COHb das soluções com 100% de COHb (teórico) após serem submetidas a diferentes tempos de borbulhamento de N_2 , empregando-se os fatores de calibração do espectrofotômetro duplo feixe. Os valores de COHb determinados nas soluções de concentração esperada de 50% são, também, mostrados nesta tabela.

Tabela X - Concentrações de carboxiemoglobina (COHb) obtidas nas soluções com 100% de COHb após terem sido submetidas a diferentes tempos de borbulhamento de N_2 e nas soluções com 50% de COHb, preparadas pela diluição com a solução 100% O_2Hb de hemoglobina reduzida.

tempo de borbulhamento de nitrogênio (min)	solução 100% COHb		solução 50% COHb		
	AR	COHb (%)	AR	COHb (%) encontrada	esperada
0	4,144 4,149	98,80	4,098 4,066	98,13	49,40
0,5	4,115 4,135	98,57	4,104 4,087	98,27	49,29
1,0	4,139 4,112	98,58	4,035 4,020	97,61	49,29
1,5	4,159 4,131	98,78	4,019 4,044	98,60	49,39
2,0	3,936 3,906	96,36	1,912 1,911	58,86	48,18
2,5	4,083 4,062	98,03	1,628 1,626	48,99	49,02
3,0	4,039 4,028	97,62	1,685 1,683	51,13	48,81

AR = razão das absorvâncias em 420 e 432 nm.

5.1.4. Fatores de calibração do espectrofotômetro

A **tabela XI** mostra as absorvâncias das soluções com 100% de COHb e 100% de Hb^{red}, em 420 e 432 nm, usadas para a determinação dos fatores de calibração, medidas nos espectrofotômetros *Intralab* DMS-80 e *Beckman* DU-70.

Os fatores de calibração F_1 , F_2 e F_3 , calculados a partir dos valores médios de absorvância e determinados para cada aparelho, estão apresentados na **tabela XII**. Nesta tabela estão relacionados também os fatores de referência¹⁵⁸.

A **figura 16** mostra os espectros de absorção correspondentes às soluções com 100% de O₂Hb, 100% de Hb^{red}, e 100% COHb.

Tabela XI - Absorvâncias das soluções de carboxiemoglobina (COHb) e de hemoglobina reduzida (Hb^{red}) usadas na determinação dos fatores de calibração dos espectrofotômetros.

solução	Beckman DU-70		Intralab DMS-80	
	420 nm	432 nm	420 nm	432 nm
100% COHb	1,2155	0,2867	1,220	0,300
	1,2068	0,2880	1,213	0,300
	1,2178	0,2938	1,222	0,303
	1,2055	0,2875	1,216	0,300
	1,2115	0,2944	1,209	0,295
	1,2158	0,2938	1,220	0,303
	1,1945	0,2937	1,215	0,305
	1,2227	0,3035	1,203	0,319
	1,2447	0,3210	1,225	0,309
	1,2008	0,3121	1,200	0,308
$\bar{x}$	1,2136	0,2975	1,2123	0,3047
s	0,0138	0,0114	0,0090	0,0066
100% Hb ^{red}	0,6365	0,8294	0,640	0,840
	0,6382	0,8368	0,640	0,848
	0,6380	0,8348	0,641	0,851
	0,6405	0,8384	0,643	0,852
	0,6421	0,8392	0,640	0,851
	0,6422	0,8377	0,646	0,854
$\bar{x}$	0,6396	0,8361	0,6417	0,8493
s	0,0024	0,0036	0,0024	0,0050

Tabela XII - Fatores de calibração obtidos experimentalmente para os espectrofotômetros e os de referência.

espectrofotômetro	fatores		
	F_1	F_2	F_3
Beckman DU-70	1,3072	0,4651	1,8974
Intralab DMS-80	1,3235	0,4741	1,8923
Referência ¹⁵⁸	1,3330	0,4787	1,9939

$$F_1 = \frac{A_{432}^{\text{Hbred}}}{A_{420}^{\text{Hbred}}}$$

$$F_2 = \frac{A_{432}^{\text{COHb}}}{A_{420}^{\text{Hbred}}}$$

$$F_3 = \frac{A_{420}^{\text{COHb}}}{A_{420}^{\text{Hbred}}}$$

Figura 16 - Espectro de Absorção das soluções com 100% de carboxiemoglobina (COHb), 100% de oxiemoglobina (O₂Hb) e 100% de Hemoglobina reduzida (Hb^{red})

5.1.5. Linearidade da técnica de quantificação

Os valores da % de COHb obtidos nas três séries de concentrações estão relacionados na **tabela XIII**. São apresentados, também, os valores de COHb esperados e corrigidos, tendo em vista que as soluções de 100% de COHb usadas na preparação das 3 séries mostravam teores de 92,46 / 93,16 e 105,27% o que levou aos fatores de correção de 0,93 / 0,93 e 1,05, respectivamente. A **figura 17A** representa graficamente estes resultados. A correlação entre as concentrações de COHb obtidas e os respectivos valores de AR estão mostrados na **figura 17B**.

A **figura 17A** representa graficamente estes resultados. A correlação entre as concentrações de COHb obtidas e os respectivos valores de AR são mostrados na **figura 17B**.

Tabela XIII - Concentrações de carboxiemoglobina (%COHb) obtidas experimentalmente pela análise de 3 séries de soluções de diferentes concentrações e os respectivos valores teoricamente esperados e corrigidos.

% COHb esperada	% COHb esperada corrigida(*)				% COHb obtida			
	1	2	3	média	1	2	3	média
1	0,93	0,93	1,05	0,97	0,48	1,10	2,00	1,19
2	1,85	1,85	2,10	1,93	0,86	2,12	2,23	1,74
4	3,71	3,71	4,21	3,88	3,17	3,15	3,62	3,31
6	5,56	5,56	6,31	5,81	4,35	5,26	5,82	5,14
8	7,41	7,41	8,42	7,75	5,86	6,33	8,64	6,91
10	9,26	9,26	10,52	9,68	8,54	7,25	10,81	8,89
14	12,96	12,96	14,73	13,55	12,84	11,88	14,65	13,12
20	18,53	18,53	21,04	19,37	16,84	16,17	22,13	18,38
30	27,79	27,79	31,57	29,05	25,99	24,62	33,06	27,69
40	37,01	37,01	42,09	38,70	34,07	33,35	41,42	36,28
50	46,32	46,32	52,61	48,42	43,48	42,58	51,10	45,72
60	55,58	55,58	63,13	58,10	52,69	51,31	60,82	54,94

(*) pelos fatores 0,93 , 0,93 e 1,05

Figura 17 (A) - Correlação entre carboxiemoglobina (COHb) obtida e os teores esperados corrigidos;

(B) - Relação entre COHb e a razão da absorvância em 420 e 432 nm (AR).

5.1.6. Precisão do método

A **Tabela XIV**, mostra os valores médios obtidos nas determinações da COHb e os respectivos intervalos nas amostras utilizadas no estudo da precisão do método. São também apresentados os valores do desvio-padrão do coeficiente de variação.

Os coeficientes de variação e os desvios-padrão referentes às concentrações de COHb determinadas nas 10 soluções hemolisadas e nas 14 alíquotas diluídas, preparadas para o estudo da influência de cada etapa da técnica na precisão, estão na **tabela XV**.

Da mesma forma os coeficientes de variação e os desvios-padrão obtidos na determinação da % de carboxiemoglobina, para comparar o uso de pipeta automática e repipetador, ao uso de pipetas comuns, estão na **tabela XVI**.

Tabela XIV - Coeficiente de variação intra-série para as diferentes concentrações de carboxiemoglobina (COHb).

amostra	n	% COHb	S	CV(%)
		$\bar{x}$ (intervalo)		
1	10	7,42 (7,21 a 7,59)	0,10	1,48
2	10	4,98 (4,78 a 5,09)	0,09	1,83
3	10	1,01 (0,96 a 1,08)	0,06	6,19
4	8	0,53 (0,40 a 0,59)*	0,06	11,86
5	8	0,15 (0,06 a 0,28)	0,07	46,67
6	8	0,01 (0,09 a 0,07)	0,07	700,00

* = valor mínimo confiável

n = número de determinações

Tabela XV - Coeficientes de variação dos valores de carboxiemoglobina (COHb) obtidos nas etapas de diluição do método; diluição do sangue com a solução hemolisante (1ª) e diluição do hemolisado com solução redutora (2ª).

etapa	n	% COHb	S	CV(%)
		$\bar{x}$ (intervalo)		
hemólise e redução	10	4,98 (4,49 a 5,12)	0,08	1,70
redução	14	5,08 (5,03 a 5,11)	0,02	0,04

n = número de determinações

Tabela XVI - Coeficiente de variação obtidos na determinação do teor de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue (a e b) utilizando pipetas automáticas e repipetadores ou pipetas comuns.

pipeta	amostra	n	COHb(%)	S	CV(%)
			$\bar{x}$ (intervalo)		
comum	a	13	4,54 (4,37 a 4,73)	0,08	1,82
	b	10	0,93 (0,76 a 1,03)	0,09	9,73
automática e repipetador	a	12	4,77 (4,62 a 4,95)	0,08	1,69
	b	10	1,16 (1,07 a 1,37)	0,08	7,07

n = número de determinações

5.1.7. Estabilidade das leituras de absorvância

A **tabela XVII** mostra os valores de COHb obtidos com as leituras das absorvâncias, em diferentes tempos após o preparo das soluções com concentrações crescentes de COHb. A **Figura 18** representa esses valores em função do tempo.

Tabela XVII - Valores de carboxiemoglobina (COHb) obtidos após períodos de tempo crescentes entre a preparação da solução reduzida e a leitura das absorvâncias.

COHb esperada	tempo (min)						
	10	20	30	40	50	60	90
2	1,98	2,07	2,02	2,15	2,04	2,01	2,18
4	4,19	4,17	4,36	4,25	4,20	4,37	4,19
6	6,25	6,04	6,09	6,17	6,27	6,33	6,21
10	11,24	10,93	10,54	10,96	11,10	10,59	11,01
15	15,78	16,16	15,88	15,50	15,26	15,34	15,03
25	27,08	26,77	27,64	25,99	25,96	25,51	25,02
50	52,50	51,72	51,05	50,78	50,00	49,29	48,23
100	94,06	93,64	92,41	91,76	91,03	89,90	87,27

Figura 18 - Variação das concentrações de carboxiemoglobina (COHb) em função do tempo entre a preparação da amostra e a leitura das absorvâncias; Soluções mantidas em células abertas.

5.1.8. Estabilidade da carboxiemoglobinemias nas amostras

As concentrações de COHb obtidas em análises diárias das 8 amostras estudadas são mostradas na **tabela XVIII**. Cada valor de COHb representa a média de três determinações.

Tabela XVIII - Concentrações de carboxiemoglobina nas alíquotas (a, b e c) de 8 amostras de sangue, determinadas em dias subseqüentes.

amostra		carboxiemoglobina (%)					
		dias após a colheita					
		1	2	3	4	7	8
1	a	3,41	3,36	3,26	3,35	3,65	3,53
	b			2,91	3,43	3,58	3,72
	c						3,57
2	a	2,63	3,01	3,02	2,76	2,72	3,30
	b			2,67	2,74	2,74	2,60
	c						2,66
3	a	4,54	4,62	4,59	4,73	4,77	4,43
	b			4,73	4,68	4,66	4,68
	c						4,72
4	a	0,87	0,94	0,94	0,98	1,16	0,84
	b			0,97	1,00	0,92	1,02
	c						1,11
5	a	0,99	1,2	1,21	1,21	1,10	1,32
	b			1,34	1,25	1,21	1,33
	c						1,46
6	a	1,73	1,99	2,10	2,16	2,14	1,95
	b			2,09	2,18	1,97	2,26
	c						2,11
7	a	1,79	2,10	1,95	2,36	1,91	2,01
	b			2,05	2,17	2,02	2,22
	c						2,01
8	a	0,85	0,77	0,68	0,84	0,70	0,98
	b			0,79	0,78	0,70	0,93
	c						0,98

5.1.9. Influência da matriz biológica

5.1.9.1. Conteúdo hemoglobínico

Os resultados obtidos na determinação da % de carboxiemoglobina em amostras de sangue preparadas com conteúdo variável de hemoglobina são mostrados na **tabela XIX**.

Tabela XIX - Valores de hemoglobina, hematócrito e concentração de carboxiemoglobina (COHb) em 5 alíquotas de amostras de sangue preparadas para conteúdo variável de hemoglobina total.

alíquota	hemoglobina (g%)	hematócrito (%)	COHb (%)
A	22,7	64	1,12
B	19,0	54	1,14
C	14,9	42	1,22
D	14,8	42	1,06 [*]
E	2,8	8	1,16
$\bar{x}$			1,14
S			0,06
CV (%)			5,12

(*) teor da amostra obtido sem a alteração da hemoglobinemia

Os resultados obtidos na determinação da concentração de carboxiemoglobina e de hemoglobina total após as diferentes diluições de 100 μL de 3 amostras de sangue, em volumes variáveis de solução hemolisante, são mostrados na **tabela XX**.

Tabela XX - Concentrações de hemoglobina (Hb), em g%, e carboxiemoglobina (COHb), em %, em soluções obtidas pela diluição de sangue (100 μL) em volumes variáveis de solução hemolisante.

volume de solução hemolisante (mL)	amostra de sangue					
	1		2		3	
	Hb	COHb	Hb	COHb	Hb	COHb
8,0	24,8	1,55	25,4	5,67	25,7	10,6
10,0	19,9	1,35*	20,4	5,59*	20,6	10,0*
12,0	16,6	1,51*	17,0	5,56*	17,2	10,2*
14,0	14,3	1,42	14,6	5,52	14,8	9,7
16,0	12,5	1,31	12,8	5,90	12,9	9,7
18,0	11,1	1,54	11,4	5,52	11,5	9,7
20,0	10,0	1,43	10,2	5,42	10,4	9,6
$\bar{x}$		1,44		5,64		9,93
S		0,09		0,19		0,36
CV (%)		6,47		3,43		3,66

(*) teor da amostra obtido sem alteração do teor hemoglobínico

5.1.9.2. Lipemia

A **tabela XXI** mostra os valores da concentração de carboxiemoglobina, hemoglobina, hematócrito e de lipídios totais encontrados nas amostras de sangue colhidas em jejum e entre uma a duas horas após a refeição.

A **tabela XXII** mostra o resultado obtido na determinação da COHb em amostra adicionada de quantidades diferentes de plasma lipêmico.

A **figura 19** mostra o espectro de absorção correspondente a uma amostra colhida em jejum e os da mesma amostra adicionada de 100 a 200 μL de plasma, de amostra colhida após a refeição, do mesmo indivíduo.

Tabela XXI - Teores de lipídios totais, hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) em amostras de sangue colhidas em jejum(a) e entre uma e duas horas após a refeição (b); teores de carboxiemoglobina (COHb) nas amostras colhidas em jejum.

amostra		lipídios (mg%)	Hb (g%)	Ht (%)	COHb (%)
1	a	507	17,9	49	4,67
	b	845	16,6	46	
2	a	507	14,4	41	3,83
	b	782	13,9	40	
3	a	523	16,1	44	3,17
	b	815	15,1	42	

Tabela XXII - Concentrações de carboxiemoglobina (COHb) e lipídios totais de amostras de sangue colhidas em jejum (a) e adicionadas de 100 μ L (b) e 200 μ L (c) de plasma lipêmico.

amostra		lipídios totais (mg %)	COHb (%)
1	a	507	4,67
	b	1352	4,70
	c	2197	4,88
2	a	507	3,83
	b	1287	3,83
	c	2071	4,03
3	a	523	3,17
	b	1338	3,25
	c	2153	3,44

Figura 19 - Espectro da absorção de amostra de sangue colhida em jejum (a) e após a adição de quantidades crescentes de lipídios (b) e (c).

5.2. Carboxiemoglobinemia em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono

Os resultados obtidos na determinação da concentração de COHb em trabalhadores de fornos de fundição de minérios de metais, do subgrupo Ia, fumantes, são mostrados na **tabela XXIII**. A **tabela XXIV** apresenta os resultados obtidos para os não-fumantes do mesmo grupo.

Tabela XXIII - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de trabalhadores do subgrupogrupo Ia, fumantes, determinada no início (i) e no final (f) da jornada de trabalho.

amostra	idade (ano)	consumo diário de cigarro	COHb (%) [*]		
			i	f	(f-i)
1	44	2	0,17	0,39	0,22
2	41	20	0,90	0,48	0,42
3	42	5	0,39	0,61	0,22
4	27	20	1,26	0,95	0,31
5	31	20	0,76	1,00	0,24
6	33	20	3,43	1,09	2,34
7	36	20	1,55	1,18	0,37
8	36	20	1,03	1,29	0,26
9	29	10	0,98	1,36	0,38
10	32	6	1,33	1,45	0,12
11	30	17	1,42	1,62	0,20
12	34	20	1,22	1,90	0,68
13	30	20	2,12	2,16	0,04
14	30	13	1,00	2,26	1,26
15	28	10	1,48	2,31	0,83
16	27	15	2,44	2,32	0,88
17	29	10	0,58	2,53	1,95
18	26	40	2,01	2,57	0,56
19	30	7	2,50	2,80	0,30
20	37	60	1,45	3,14	1,69
21	30	20	2,01	3,18	1,17
22	41	30	2,40	3,30	0,90
23	29	20	2,00	3,40	1,40
24	26	15	4,07	3,69	0,38
25	31	20	3,24	4,17	0,93
26	35	20	2,70	4,29	1,59
27	27	13	3,60	4,40	0,80
28	35	20	2,62	4,46	1,84
29	46	20	4,09	5,06	0,97
30	24	15	4,07	5,90	1,83
31	49	20	3,33	5,95	2,64
32	33	30	5,20	6,00	0,80
33	29	20	1,80	6,03	4,24
34	28	20	4,00	7,10	3,10
$\bar{x}$	33	19	2,15	2,95	0,78
S	6	10	1,26	1,84	1,20

(*) valor mínimo confiável 0,50%

Tabela XXIV - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de trabalhadores do grupo Ia, não-fumantes, determinada após a jornada de trabalho.

amostra	idade (ano)	COHb* (%)
1	28	0,26
2	37	0,48
3	34	0,49
4	34	0,51
5	36	0,52
6	26	0,54
7	33	0,56
8	29	0,60
9	32	0,60
10	29	0,62
11	23	0,68
12	25	0,70
13	26	0,71
14	30	0,75
15	40	0,76
16	33	0,90
17	55	0,92
18	37	1,00
19	46	1,10
20	46	2,05
21	44	2,10
22	30	2,20
23	28	5,99
$\bar{x}$	34	1,09
S	8	1,19

(*) valor mínimo confiável 0,50%

Os resultados obtidos na determinação da concentração de COHb em trabalhadores de fornos de fundição de minérios de metais, do subgrupo Ib, são mostrados nas **tabelas XXV e XXVI**, fumantes e não-fumantes, respectivamente.

Tabela XXV - Concentração de carboxiemoglobina em amostras de sangue de trabalhadores do grupo Ib, fumantes, determinada no início (i) e no final (f) da jornada de trabalho.

área de trabalho	amostra	idade (ano)	cigarro		carboxiemoglobina(%)		
			consumo diário	marca	i	f	(f-i)
fornos							
	1	33	25	Continental	4,20	4,60	0,40
	2	22	20	Carlton	4,22	4,67	1,11
	3	50	20	Belmont	5,41	6,50	1,09
	4	39	20	Hollywood	4,73	6,70	1,97
vazamento							
	5	24	5	Continental	1,34	1,03	-0,31
	6	35	10	Monterey	3,32	3,31	-0,01
	7	45	20	Continental	4,86	4,78	-0,08
	$\bar{x}$	35	17		4,01	4,51	0,60
	S	10	7		1,34	1,93	0,83

Tabela XXVI - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de trabalhadores do grupo Ib, não-fumantes, determinada no final de jornada de trabalho.

área de trabalho	amostra	idade (ano)	COHb (%)
fornos			
	1	43	1,09
	2	57	1,11
	3	37	1,16
	4	42	1,24
	5	46	1,26
	6	42	1,30
	7	48	1,34
vazamento			
	8	49	0,86
	9	32	1,10
	10	41	1,10
	11	29	1,11
	12	42	1,20
	13	41	1,23
	14	46	1,48
	$\bar{x}$	43	1,18
	S	7	0,15

As tabelas XXVII e XXVIII, mostram os resultados obtidos na determinação da concentração de COHb em trabalhadores de fornos de fundição de minérios de metais do subgrupo Ic, fumantes e não-fumantes, respectivamente.

Tabela XXVII - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de trabalhadores do subgrupo Ic, fumantes, determinada no final da jornada de trabalho.

área de trabalho	amostra	idade (ano)	cigarro		COHb (%)
			consumo diário	marca	
fornos	1	46	4	V	1,59
	2	43	3	Minister	2,08
	3	27	15	V	2,33
	4	38	10	Hollywood	2,98
	5	57	20	V	4,01
	6	44	20	Continental	5,48
	7	19	7	Hollywood	5,78
	8	33	35	Tropical	5,79
	9	46	20	Mustang	6,29
	10	58	10	Plaza	7,06
	11	36	36	Minister	9,25
vazamento	12	20	3	Plaza	0,57
	13	34	1	Plaza	0,70
	14	31	1	Hollywood	1,24
	15	27	8	V	2,59
	16	29	7	Hollywood	2,63
	17	36	7	Plaza	2,86
	18	41	20	Hollywood	3,08
	19	25	7	Plaza	3,36
	20	39	7	Belmonte	4,13
	21	44	15	Continental	4,31
	22	23	20	Plaza	4,36
	23	42	20	Hollywood	4,71
	24	45	30	Hollywood	4,87
	25	41	20	Continental	4,98
	26	36	15	Hollywood	5,03
	27	45	20	Hollywood	5,80
	28	29	20	Hollywood	6,00
	29	32	20	Belmont	7,77
	30	28	15	V	8,08
	$\bar{x}$	37	15		4,32
	S	10	9		2,19

V = variável

Tabela XXVIII - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de trabalhadores do subgrupo Ic, não-fumantes, determinada no final da jornada de trabalho.

área de trabalho	amostra	idade (ano)	COHb* (%)
fornos	1	42	0,20
	2	29	0,25
	3	39	0,29
	4	35	0,30
	5	33	0,31
	6	38	0,31
	7	40	0,32
	8	41	0,34
	9	60	0,39
	10	30	0,44
	11	40	0,51
	12	47	0,53
	13	29	0,54
	14	35	0,68
	15	34	1,02
	16	40	1,04
	17	36	1,18
	18	40	1,24
	19	36	2,53
vazamento	20	48	0,19
	21	43	0,21
	22	31	0,28
	23	45	0,43
	24	43	0,46
	25	34	0,61
	26	48	0,67
	27	31	0,72
	28	25	0,74
	29	26	0,76
	30	28	0,81
	31	38	0,81
	32	22	0,84
	33	29	0,85
	34	19	0,87
	35	38	0,91
	36	27	0,99
	37	34	1,06
	38	39	1,06
	39	34	1,14
	40	42	1,53
	41	23	2,87
	42	27	6,83
$\bar{x}$		36	0,91
S		8	1,09

(*) Valor mínimo confiável 0,50%

Os resultados obtidos na determinação da carboximeglobinemia em indivíduos que trabalham na regulação de motores de veículos, do grupo II, são mostrados nas **tabelas XXIX e XXX**, respectivamente, para indivíduos fumantes e não-fumantes.

Tabela XXIX - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de trabalhadores do grupo II, fumantes, determinada no final da jornada de trabalho.

amostra	idade (ano)	cigarro		marca	COHb (%)
		consumo			
		no dia	por dia		
1	33	1	2	Shelton	2,17
2	19	2	5	Marlboro	2,86
3	25	5	18	Marlboro	4,85
4	26	18	40	Shelton	5,07
5	29	4	6	Carlton	5,12
6	36	6	10	Marlboro	5,22
7	43	1	2	Shelton	5,77
8	34	8	20	Winston	6,09
9	41	4	10	Ritz	6,25
10	26	9	17	Ritz	6,80
11	56	14	15	Leuxer	7,15
12	28	10	20	Belmont	7,45
13	20	8	15	Marlboro	7,53
14	29	7	10	Plaza	7,82
15	27	12	10	Galax	7,84
16	35	12	15	Shelton	7,91
17	23	20	20	Free	7,96
18	37	6	10	Free	8,43
19	24	10	20	Plaza	8,43
20	25	8	10	Marlboro	8,54
21	42	10	20	Hollywood	8,68
22	19	6	8	Hollywood	8,83
23	30	5	10	Minister	8,93
24	22	8	15	Marlboro	9,18
25	42	10	15	Plaza	9,44
26	33	10	20	Hollywood	9,62
27	34	8	25	Hilton	9,88
28	18	9	13	Marlboro	10,95
29	41	10	20	Free	11,99
$\bar{x}$	31	8	15		7,48
S	8	4	8		2,22

Tabela XXX - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de trabalhadores do grupo II, não-fumantes, determinada no final da jornada de trabalho.

amostra	idade (ano)	COHb (%)
1	44	1,81
2	32	1,97
3	20	2,08
4	26	2,09
5	33	2,18
6	42	2,27
7	26	2,61
8	35	2,70
9	40	2,83
10	20	3,02
11	21	3,03
12	20	3,28
13	57	3,37
14	42	3,69
15	20	3,95
16	25	4,12
17	32	4,46
18	29	4,86
19	36	4,92
20	21	5,65
21	37	5,88
22	20	6,67
23	49	6,83
24	43	7,26
25	42	7,32
26	25	7,45
27	40	8,38
28	30	8,61
29	39	8,95
30	18	9,28
$\bar{x}$	32	4,72
S	10	2,38

Os resultados na determinação da concentração de COHb em indivíduos controle, não-expostos ocupacionalmente ao CO, fumantes e não-fumantes são mostrados nas **tabelas XXXI e XXXII** respectivamente.

Tabela XXXI - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de indivíduos fumantes do grupo controle.

amostra *	idade (ano)	cigarro		COHb (%)
		consumo diário	marca	
1	13	8	Free	2,35
2	26	14	Hollywood	2,69
3	22	15	Galaxy	2,78
4	23	11	Hollywood	2,96
5	22	20	Galaxy	3,02
6	24	20	Galaxy	3,64
7	30	8	Carlton	3,65
8	15	15	Marlboro	3,73
9	15	15	Marlboro	4,56
10	29	10	Marlboro	4,72
11	26	15	Galaxy	5,15
12	21	10	Marlboro	5,22
13	26	20	Galaxy	5,22
14	21	12	Marlboro	5,30
15	22	10	Hollywood	5,75
16	28	20	Hollywood	5,83
17	25	12	Minister	6,83
18	21	10	Marlboro	7,33
19	28	30	Luis XV	8,32
$\bar{x}$	23	15		4,69
S	5	6		1,67

(*) colhida 6 horas após o início das atividades diárias

Tabela XXXII - Concentração de carboxiemoglobina (COHb) em amostras de sangue de indivíduos do grupo controle, não-fumantes.

amostra *	idade (ano)	COHb **	amostra	idade (ano)	COHb
1	28	0,10	43	20	0,74
2	42	0,14	44	14	0,75
3	29	0,20	45	25	0,76
4	29	0,20	46	50	0,78
5	18	0,25	47	43	0,81
6	34	0,25	48	23	0,83
7	21	0,29	49	68	0,84
8	25	0,30	50	50	0,85
9	23	0,31	51	50	0,85
10	33	0,32	52	21	0,87
11	37	0,34	53	42	0,89
12	49	0,34	54	23	0,94
13	22	0,35	55	20	0,94
14	20	0,37	56	67	0,95
15	58	0,38	57	33	0,96
16	12	0,40	58	22	1,02
17	24	0,42	59	32	1,04
18	36	0,45	60	28	1,04
19	19	0,47	61	21	1,04
20	32	0,49	62	64	1,06
21	30	0,49	63	31	1,27
22	33	0,51	64	41	1,38
23	53	0,52	65	24	1,40
24	20	0,53	66	38	1,50
25	24	0,53	67	13	1,52
26	24	0,53	68	63	1,68
27	42	0,54	69	15	1,69
28	26	0,55	70	20	1,69
29	59	0,56	71	20	1,71
30	22	0,59	72	20	1,72
31	21	0,61	73	67	1,73
32	25	0,62	74	23	1,73
33	64	0,63	75	43	1,73
34	60	0,64	76	55	1,77
35	13	0,65	77	34	1,92
36	30	0,65	78	70	2,04
37	26	0,65	79	27	2,28
38	70	0,65	80	21	2,80
39	38	0,65			
40	29	0,65			
41	53	0,70			
42	30	0,72			
			$\bar{x}$	34	0,86
			S	16	0,56

(*) colhida em horário variável

(**) Valor mínimo confiável 0,50%

A figura 20 mostra a distribuição percentual da concentração de carboxiemoglobina em trabalhadores dos grupos: controle, Ia, Ic e II, fumantes e não-fumantes.

Figura 20 - Distribuição percentual de indivíduos fumantes e não-fumantes por faixa de concentração de carboxiemoglobina (%) em grupo controle (I) e grupos e subgrupos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono (Ia e Ib - fundição de ferro e II - regulagem de motores de combustão interna); n = número de indivíduos

6. DISCUSSÃO

A otimização de um procedimento analítico com vistas à determinação de carboxiemoglobina em indivíduos expostos ocupacionalmente ao CO constitui o objetivo precípuo deste trabalho.

Para tanto, na revisão bibliográfica do assunto, foram selecionadas técnicas analíticas compatíveis que apresentassem sensibilidade, precisão e exatidão, além de simplicidade e aplicabilidade a grande número de amostras.

A determinação direta da carboxiemoglobinemia por espectrofotometria^{20,29,43,53,140,142,158} apresenta vantagens sobre as indiretas^{38,41,49,92,133} (quantificação por cromatografia gasosa do monóxido de carbono liberado da COHb) quanto ao aspecto de custo e complexidade dos equipamentos requeridos.

Os métodos espectrofotométricos que utilizam a região *Soret* do espectro visível (390 a 440 nm)^{20,29,140,142,158,177} apresentam maior sensibilidade que os preconizados por alguns autores com leituras na faixa de 480 a 580 nm^{43,53,56,99,150}. A figura 21 reproduz o espectro de dois pigmentos hemoglobínicos mostrando a maior absorção na região *Soret*.

Figura 21 - Espectro de absorção de 3 soluções com concentrações diferentes de carboxiemoglobina (COHb) e hemoglobina reduzida (Hb^{red}).

Dentre os métodos que utilizam esta região do espectro, foi selecionado para este estudo o de BEUTLER & WEST²⁰ por não requerer a saturação de cada amostra de sangue com oxigênio e com monóxido de carbono e pela particularidade de usar fatores de calibração do espectrofotômetro.

Neste método, a sequência analítica é simples, podendo ser entendida como duas diluições subseqüentes. A concentração de carboxiemoglobina é calculada pela razão das absorvâncias da amostra diluída em 420 e 432 nm, e pelos fatores que correlacionam as absorvâncias molares da hemoglobina reduzida e da carboxiemoglobina nos dois comprimentos de onda.

No método de BEUTLER & WEST²⁰, fundamentado no de RODKEY *et al.*¹⁵⁸, foi introduzido no procedimento analítico o tamponamento do meio (pH=6,85), o que torna desnecessário o resguardo das amostras do contato com o ar e estabiliza a relação das absorvâncias (AR) por até uma hora.

Neste trabalho, a exposição da amostra de sangue ao ar ambiente foi evitada apenas no período compreendido entre a colheita e a análise. Tanto na obtenção como na conservação das amostras foi utilizado um tubo para colheita a vácuo contendo heparina sódica como anticoagulante, conforme preconiza a maioria dos autores^{6,20,29,36,41,43,53,56,67,96,99,136,140,150,186,215}. O sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-Na₂) também tem sido recomendado como anticoagulante^{4,33,100,168}. A amostra deve ser mantida sob refrigeração entre 4 e 8 °C.

Na otimização do método, dois aspectos merecem ser destacados: a avaliação do desempenho do aparelho e a qualidade do reagente redutor, o ditionito.

A exatidão do comprimento de onda é importante na obtenção de resultados confiáveis, especialmente em análises que não utilizam padrões do cromóforo, como ocorre na quantificação da carboxiemoglobina.

Um dos métodos de avaliação da exatidão do comprimento de onda, ou seja, a verificação da concordância entre o valor do comprimento de onda assinalado na escala seletora e o da energia radiante proporcionada pelo seletor da faixa espectral, é a determinação do ponto isobéstico. Este representa o comprimento de onda no qual as duas substâncias convertíveis entre si têm a mesma absorvância⁹⁵.

Os pontos isobésticos devem ser próximos aos comprimentos de onda requeridos pelo método em questão. Assim, este foi determinado em 445 nm usando soluções de dicromato em meio ácido e básico. O valor obtido atestou bom desempenho nos aparelhos usados. GÜNTER⁹⁵ sugere o uso de derivados hemoglobínicos para este fim podendo ser usado o par oxiemoglobina e carboxiemoglobina, com pontos isobésticos em 421 e 449 nm.

Como a resolução do espectro de absorção pode ser influenciada pela largura da fenda e pela velocidade de varredura da faixa de comprimento de onda^{77,140}, estes parâmetros foram fixados para cada espectrofotômetro.

A velocidade de varredura automática usada no aparelho da marca *Beckman*, modelo DU-70, com sistema de leitura da absorvância monofeixe, foi de 1200 nm/min e a largura da fenda do monocromador de 2 nm. Para o espectrofotômetro da marca *Intralab*, modelo DMS-80, duplo feixe, e sem acessório para varredura automática, a largura da fenda usada também foi de 2 nm. As leituras obtidas foram mais estáveis por ser de duplo feixe.

Por este motivo, as determinações de COHb necessárias à otimização e à aplicação do método foram feitas no espectrofotômetro de duplo feixe.

Outro aspecto a ser considerado é a qualidade do agente redutor - ditionito - que requer condições de armazenamento especiais. Em contato com o ar e, mais rapidamente quando em solução, o ditionito oxida-se a bissulfito e bissulfato perdendo a sua capacidade redutora:

O bissulfito de sódio, NaHSO_3 , é ineficaz como agente redutor e pode ser rapidamente formado se o ditionito em pó (seco) for exposto ao ar úmido:

A concentração e a qualidade do ditionito têm, assim, papel crítico na análise das amostras de sangue^{50,51,107,142}. Por isso, foi adotada a seguinte conduta:

- manter o ditionito em recipiente fechado e em dessecador;
- durante o preparo da solução redutora o sal deve ser exposto o menor tempo possível ao ar ambiente;
- pesar exatamente o sal e dissolvê-lo imediatamente, no momento do seu uso;
- diminuir ao máximo o volume de ar no recipiente contendo a solução redutora (capacidade do recipiente igual ao volume de solução).

A qualidade do ditionito pode ser testada pela adição de 25mg de *o*-dinitrobenzeno a 10 mL de solução de hidróxido de potássio 5% em metanol; a esta mistura adicionar 25 mg de ditionito. A solução deve apresentar imediatamente forte coloração violeta. Se o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ não for de boa qualidade, a reação não se verifica ou a coloração formada é fraca¹⁴².

Na otimização do método, o procedimento analítico proposto por BEUTLER & WEST²⁰, foi mantido sem alterações. Entretanto, na determinação dos fatores de calibração dos espectrofotômetros foram introduzidas modificações que permitiram obtenção de resultados satisfatórios.

A determinação dos fatores requer soluções com 100% de COHb e 100% de Hb^{red}. Na preparação destas, encontram-se na literatura, basicamente, a técnica de borbulhamento dos gases em soluções de hemoglobina^{20,43,95,142} e a da saturação pelo contato dos gases com a solução de Hb, usando tonômetro, seringa ou outros recipientes^{41,56,140,186}.

A opção, neste trabalho, pelo uso da primeira técnica deu-se, pela intenção de se estabelecer um método adequado às condições da maioria dos laboratórios em nosso país e pela dificuldade de se medir volumes de gases.

A amostra de sangue usada na preparação das duas soluções saturadas deve ser escolhida com determinados critérios: ser de indivíduo não fumante, facilitando assim a preparação da solução 100% O_2Hb e não apresentar metaemoglobinemia maior que 1% ou outros derivados da Hb, que não se ligam ao CO, cuja presença impede a formação de COHb^{4,92}. Foi tido o cuidado de determinar a metaemoglobina nas amostras utilizadas com tal finalidade pelo método de HEGESH *et al.*⁹⁰, obtendo-se o valor médio de 0,51%.

A preparação das soluções de 100% de Hb^{red} ou de 100% de COHb é

feita de maneira similar, diferindo apenas nos tempos de borbulhamento dos gases, monóxido de carbono ou oxigênio, que foram definidos pela estabilidade das concentrações obtidas em tempos crescentes de borbulhamento.

Para se estabelecer o tempo mínimo de borbulhamento do gás, que permita preparar com certa confiança a solução de hemoglobina saturada, é importante lembrar que ele varia com as condições disponíveis, tais como, o tipo de aparelhagem usado no borbulhamento, o fluxo, a natureza e a pureza do gás e a quantidade de hemoglobina a ser saturada.

O **tempo de 15 min**, estabelecido para a preparação da solução 100% de O_2Hb , é válido para o uso de oxigênio medicinal, proveniente de cilindro de gás comprimido, e de um borbulhador que permita fluxo aproximado de 50 mL/min (tabela VIII). O **tempo de 3 minutos** de CO proveniente de cilindro de gás comprimido foi estabelecido nas mesmas condições (tabela VII).

BEUTLER & WEST²⁰ recomendam os tempos de 30 minutos de CO na preparação de 100% de COHb, sem definir a procedência do gás, e de 2 horas de ar para a obtenção da solução 100% O_2Hb , usando 2,0 mL de hemolisado contidos em balões volumétricos de 25,0 mL. A substituição desta técnica pelo borbulhamento em maior volume num tubo de ensaio permitiu maior exatidão na preparação das soluções saturadas.

A necessidade da calibração dos balões volumétricos de 25,0 mL, usados nesta etapa, foi constatada pela variação nos volumes reais encontrados, de 23,0 a 26,0 mL.

As soluções, cujas absorvâncias são usadas na determinação dos fatores (descrita em 4.1.2.2.) devem apresentar o mesmo conteúdo hemoglobínico, pois nos cálculos usa-se a relação de absorvâncias e não de absortividades. Isoladamente, o cálculo do F1 não é afetado por relacionar as absorvâncias da mesma solução em dois comprimentos de onda, o que não ocorre no cálculo de F2 e F3.

A preparação das soluções com 100% COHb e 100% Hb^{red} e a leitura das suas absorvâncias podem ser consideradas as etapas de maior influência na exatidão do método.

Conhecendo-se o custo elevado do cilindro de CO (grau de pureza

99,99%) e a dificuldade em obtê-lo, foi estudada a possibilidade do uso do CO produzido por reação química.

A determinação do tempo de borbulhamento adequado foi conduzida de maneira similar à usada para o gás proveniente de cilindro, com variações decorrentes da dificuldade de se controlar o seu fluxo, devido à inconstância na sua geração e a incerteza da sua pureza. A liberação do gás em menor fluxo, comparativamente ao do cilindro, não permitiu o uso do borbulhador.

Para se estabelecer o tempo de borbulhamento adequado do gás gerado foram estudadas várias séries com diferentes tempos de borbulhamento como mostra a tabela IX. Pelos resultados obtidos na primeira série pode-se concluir que, se houve diminuição da produção de monóxido de carbono no final da reação, esta foi compensada pelo aumento do tempo de borbulhamento e que os 5 minutos iniciais não foram suficientes para a saturação da solução.

Na segunda série o tempo total da reação foi menor, permitindo apenas o uso de 3 alíquotas de hemolisado; os primeiros 10 minutos foram suficientes para a saturação da Hb assim como os tempos subsequentes. Nas séries seguintes, procurou-se manter os tempos de borbulhamento sequenciais iguais, para avaliar se a produção de CO seria constante até o final da reação e em quantidade suficiente para saturar a solução de hemoglobina.

Analisando-se os resultados obtidos nas cinco séries, pode-se estabelecer que, excluindo-se os 5 minutos iniciais de produção de CO, cada um dos 15 minutos seguintes é suficiente para a obtenção da solução saturada de COHb. Os primeiros cinco minutos foram excluídos pela inconstância da coloração do hemolisado, pelos baixos teores de COHb encontrados, e pelo fato do borbulhamento inicial não ser apenas do CO gerado mas também do ar contido no kitassato.

Na repetição das reações, observou-se que quando o gotejamento inicial do ácido era lento a primeira alíquota da sequência apresentava coloração esperada (vermelho-cereja). Se a quantidade de ácido adicionada fosse maior, ocorria borbulhamento intenso e o hemolisado tornava-se enegrecido. Esta alíquota, submetida a maior tempo de borbulhamento, não atingia o teor de 100% de COHb. Possivelmente deve ter ocorrido a formação de sulfaemoglobina, composto de coloração verde que se combina com o CO formando a carboxisulfaemoglobina (COSHb) ^{21,57,139}.

O rendimento da reação de geração de CO pode ser aumentado pela adição de esferas de vidro ao formiato de sódio que dificultam a formação da crosta de sulfato de sódio e facilitam a homogeneização por agitação manual do kitassato.

Na preparação das soluções saturadas de COHb e de Hb^{red} ocorre também a dissolução dos gases no líquido. A fração dissolvida deve ser removida por impossibilitar a preparação de concentrações variáveis de COHb e para evitar a contribuição da absorvância molar do gás na medida das absorvâncias.

A ação redutora do ditionito sobre o O₂ dissolvido e a redução da O₂Hb a Hb^{red} eliminam esta interferência na solução com 100% de O₂Hb. Entretanto, o CO permanece dissolvido na solução 100% de COHb.

Assim sendo, foi borbulhado o nitrogênio para remover os gases dissolvidos nas soluções saturadas. O tempo de borbulhamento foi determinado pela comparação entre as % de COHb encontradas e a concentração esperada de 50%. O tempo adequado foi de 2,5 minutos (tabela X); que foi adotado, também, para a solução 100% de O₂Hb.

Os tempos de borbulhamento de CO, O₂ e N₂ devem ser determinados se forem usadas outras condições laboratoriais devido à influência de uma série de fatores, mencionados anteriormente .

Após a diluição da solução de O₂Hb com a solução redutora deve-se respeitar o tempo de 10 minutos para que ocorra a redução total, uma vez que os espectros de absorção da O₂Hb e da COHb são parcialmente coincidentes. A não observância desta conduta leva a uma superestimação do valor de COHb.

O cálculo dos fatores de calibração do espectrofotômetro pode ser feito, indiferentemente, pelas razões das médias ou pela média das razões das absorvâncias. Embora não seja usado o valor de AR das soluções saturadas para este cálculo, é importante conhecê-lo e relacioná-lo à saturação de carboxiemoglobina.

É importante salientar que uma solução de COHb com maior absorvância em 420 nm, não apresenta, necessariamente, maior teor de COHb podendo estar refletindo, somente, o maior conteúdo hemoglobínico.

A **figura 22** denota que os espectros das soluções com 50 e 60% de COHb não apresentam correlação direta entre a % de COHb e absorvância.

Figura 22 - Espectro de absorção de soluções com diferentes concentrações de carboxiemoglobina (1,5,15,30,50,60,80 e 100% de COHb)

A determinação dos fatores de calibração não precisa ser realizada simultaneamente à análise das amostras de sangue. Entretanto, de acordo com nossa experiência, deverá ser repetida após uma revisão técnica ou sempre que o aparelho for demovido.

Resumidamente, nas etapas que envolvem a determinação dos fatores de calibração é importante ressaltar :

- a interferência dos diferentes pigmentos hemoglobínicos presentes na amostra na preparação das soluções 100% de COHb e 100% de Hb^{red};
- a presença de CO dissolvido na solução 100% de COHb;
- a diminuição da exatidão causada pela diferença de conteúdo hemoglobínico entre as soluções 100% de COHb e 100% Hb^{red};

- a possível alteração da coloração do hemolisado quando se usa o CO gerado por reação química para a preparação da solução 100% de COHb.

O estudo da exatidão deste método espectrofotométrico foi limitado pela indisponibilidade de soluções-padrão de referência de COHb e de O₂Hb. Para contornar a limitação, os teores de carboxiemoglobina, obtidos nas soluções saturadas, foram calculados com os fatores de calibração do espectrofotômetro por nós determinados e cotejados aos calculados com os fatores teóricos indicados na literatura, determinados pelas absorvidades molares dos pigmentos¹⁵⁸ (tabelas VII e VIII). A concordância entre eles permite estabelecer a exatidão do método como adequada.

Para se estudar a linearidade de um método espectrofotométrico, com leitura da absorvância em apenas um comprimento de onda, determina-se a curva de calibração relacionando a concentração da substância e as absorvâncias respectivas.

Seguindo este raciocínio, a linearidade no presente método seria obtida pela correlação entre as concentrações de COHb e as razões das absorvâncias. A figura 17-B mostra que esta não é linear, pois se comporta de maneira diferente para baixas e altas concentrações. Pequena variação num valor baixo de AR (baixas concentrações de COHb), causa uma variação relativamente maior no resultado da % de COHb do que a ocasionada por variações similares em valor elevado de AR (altas concentração de COHb).

Por outro lado, observa-se correlação linear entre os valores esperados e os encontrados na faixa de 0 a 100% de COHb (figura 17-A). Na preparação das diferentes concentrações de COHb, a supressão da etapa de borbulhamento de N₂ compromete acentuadamente esta correlação nas soluções com baixos teores de COHb, como ilustra a **figura 23**. Neste estudo as leituras de absorvância das soluções, inclusive a com 100% de COHb, foram realizadas 10 minutos após a adição do agente redutor, de modo similar à técnica aplicada às amostras autênticas.

A precisão do método mostra comportamento variável em função da concentração apresentando coeficientes de variação (CV) inversamente proporcionais às concentrações de COHb. Os desvios-padrão obtidos neste estudo mostram que a dispersão dos resultados é independente da concentração de COHb (tabela XIV).

Figura 23 - Correlação entre as % de carboxiemoglobina (COHb) obtidas experimentalmente, com (•) e sem (■) o deslocamento do CO dissolvido na solução saturada de COHb.

Estes dados permitem fixar o valor mínimo confiável do método em 0,50 % de COHb. Dos 349 resultados de carboxiemoglobinemia obtidos, em 155 amostras de fumantes apenas 4 (2,6%) foram inferiores à concentração mínima confiável; nas 189 amostras de não-fumantes este valor foi de 39 (20,6%) sendo 20 pertencentes ao grupo controle e 15 ao subgrupo Ic, que foi o único grupo que não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle.

O estudo da influência de cada uma das etapas de diluição (hemólise e redução) na precisão do método mostrou que a variação do resultado é quase que exclusivamente determinada pela primeira diluição (tabela XV). Isto se deve, provavelmente, à variação na pipetagem de pequeno volume de sangue.

Na tentativa de diminuir o tempo dispendido na análise de cada amostra, foi avaliada a substituição do uso de pipetas comuns por automáticas e repipetadores. A utilização da pipetagem automática aumentou a desenvoltura da técnica sem prejudicar a precisão do método, como demonstram os coeficientes de variação observados na tabela XVI.

Nos métodos espectrofotométricos é importante investigar a estabilidade do cromógeno na solução final de leitura para que a exatidão e a

precisão do método não sejam comprometidas.

O presente estudo mostrou que as soluções são estáveis durante o período de uma hora, após a sua preparação, concordando com o reportado por BEUTLER & WEST, como se pode ver na figura 18.

A possibilidade da perda de CO durante o período de conservação da amostra após a colheita, motivou o estudo da estabilidade da carboxiemoglobina na mesma, para se conhecer a necessidade da urgência no prosseguimento do processo analítico e, portanto, da sua viabilidade prática.

A estabilidade foi avaliada comparando-se os resultados da análise de 3 amostras, obtidas pelo sistema de colheita múltipla, a vácuo (mesma punção venosa). A colheita das 3 amostras permite contornar a influência do contato da amostra com o ar que ocorre inevitavelmente quando a mesma é analisada diariamente.

Para a análise dos valores obtidos neste estudo (tabela XVIII) foi aplicado o **TESTE F**¹⁷⁵ em dois grupos de resultados: (i) os obtidos nas amostras mantidas em vácuo; (ii) a todos os resultados de todas as amostras. A análise de variância das médias diárias permite concluir, ao nível de significância de 99%, que os grupos não são estatisticamente diferentes. Desta forma a amostra pode ser considerada estável por até 8 dias.

Dada a possibilidade dos constituintes da matriz biológica atuarem como interferentes na determinação espectrofotométrica²¹, foram realizados ensaios para avaliar a influência de alguns deles.

O estudo da influência do conteúdo hemoglobínico foi conduzido em em dois ensaios. No primeiro, pela determinação da carboxiemoglobina em alíquotas de uma amostra, variando-se a sua hemoglobinemia numa faixa que extrapola os valores considerados normais, que é de 12 a 17%. O coeficiente de variação dos resultados obtidos (tabela XIX) foi de 5,12% para um valor médio de 1,14% de COHb, o que é similar ao encontrado para este teor, conforme o estudo da precisão do método (tabela XIV).

O segundo ensaio foi realizado para ampliar este estudo a concentrações maiores de COHb. Os resultados do primeiro estudo permitiram estreitar a faixa de concentração de hemoglobina a ser estudada. A preparação de

concentrações de hemoglobina mais próximas entre si, requereu portanto, outro procedimento de diluição. O coeficiente de variação dos resultados obtidos para a concentração próxima a 1% foi concordante com o estudo anterior, porém, para concentrações maiores, os coeficientes de variação apesar de aumentados (tabela XX), não comprometem a precisão do método

A comparação dos valores de COHb obtidos com o valor da amostra, sem a variável *concentração de Hb*, permite concluir que em ambos os estudos o teor de hemoglobina não interfere na quantificação da carboxiemoglobina.

Outro aspecto considerado foi a possível influência da opalescência das amostras nas leituras das absorvâncias. Este fato, aliado à recomendação de que a amostra seja colhida no final da jornada de trabalho⁵, assume importância relevante dada a possibilidade da colheita da amostra ser realizada no período pós-prandial, dependendo do turno de trabalho.

Foram colhidas amostras de um mesmo indivíduo, fumante, em jejum e após a refeição. O teor de lipídios nas amostras do período pós-prandial duplicou em relação às colhidas em jejum. Por não ser possível comparar diretamente a carboxiemoglobinemia entre as amostras do mesmo indivíduo, o soro lipêmico foi adicionado à amostra do mesmo indivíduo em jejum, triplicando e até quadruplicando a lipemia.

Os teores iniciais de COHb não se alteraram na triplicação da quantidade de lipídios e apresentaram um aumento de 6% quando esta foi quadruplicada (tabela XXII). Tais resultados mostram que a amostra colhida no período pós-prandial não influencia significativamente a determinação da COHb.

Após serem criteriosamente estabelecidas as várias etapas do método e dispor-se do procedimento analítico otimizado, foi determinada a carboxiemoglobinemia em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono, subdivididos em grupos e subgrupos de acordo com o tipo e local de trabalho.

A colheita das amostras foi realizada preferencialmente no final da jornada de trabalho, conforme preconiza a AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH)⁵. Dos indivíduos fumantes dos subgrupos I_a e I_b foram colhidas, também, amostras no início da jornada. Para auxiliar a interpretação dos resultados, foi incluído o estudo em um grupo controle, constituído de indivíduos não-expostos ocupacionalmente ao CO.

Os trabalhadores de todos os grupos pertenciam ao turno diurno com jornada de trabalho de 8 horas diárias; executavam as tarefas com esforço físico de leve a moderado e nenhum deles usava equipamento de proteção respiratória.

A influência considerável do hábito de fumar na carboxiemoglobinemia torna necessário subdividir a população estudada em fumantes e não-fumantes.

Os teores médios de COHb para os grupos estudados, fumantes e não-fumantes, foram muito próximos das respectivas medianas, o que condiz com a distribuição das frequências dos resultados. A mediana é mais representativa do grupo de resultados quando a distribuição não é normal, ou seja, um ou poucos valores discrepantes da média da população podem deslocar significativamente o valor médio^{153,198}.

A **tabela XXXIII** mostra a mediana e os valores médios da COHb obtidos. A distribuição da frequência dos indivíduos de cada grupo em função dos teores de COHb está representada na figura 20. O subgrupo I_b não foi representado por ser pequeno o número de amostras.

As comparações entre os resultados da carboxiemoglobinemia nos diferentes grupos estudados foram submetidas à análise estatística. Na escolha da prova estatística para a tomada de decisão sobre determinada hipótese, é fundamental que se considere o poder de eficiência da prova e a adequabilidade ao tipo e número de dados obtidos^{19,153,175,198}.

Formuladas as hipóteses H_0 (de nulidade) e H_1 (a alternativa), o estudo estatístico conduz à aceitação de uma delas, levando à conclusão de igualdade ou não entre os grupos. Por exemplo:

H_0	grupo controle = grupo exposto
H_1	grupo controle $\neq$ grupo exposto
ou	
H_0	grupo fumante = grupo não-fumante
H_1	grupo fumante $\neq$ grupo não-fumante

Tabela XXXIII - Medianas e médias ($\bar{x}$) dos teores de carboxiemoglobinemias obtidos em fumantes e não-fumantes nos grupos expostos ou não ocupacionalmente ao monóxido de carbono (CO).

grupo	fumante			não-fumante		
	n	mediana	$\bar{x}$ (intervalo)	n	mediana	$\bar{x}$ (intervalo)
controle	19	4,72	4,69 (2,35 a 8,32) ^a	80	0,68	0,86 (0,10 a 2,80) ^a
exposto						
I _a	34	2,57	2,95 (0,39 a 7,10) ^a	23	0,70	1,09 (0,26 a 5,99) ^a
	34	2,01	2,15 (0,17 a 5,20) ^b			
I _b	7	4,67	4,51 (1,03 a 6,70) ^a	14	1,18	1,18 (0,86 a 1,44) ^a
	7	4,22	4,01 (1,34 a 5,41) ^b			
I _c	30	4,34	4,32 (0,57 a 9,25) ^a	42	0,70	0,91 (0,19 a 6,83) ^a
II	29	7,84	7,48 (2,17 a 11,99) ^a	30	4,04	4,72 (1,81 a 9,28) ^a

(a) colheita da amostra no final da jornada de trabalho

(b) colheita da amostra no início da jornada de trabalho

n = número de amostras

Desta forma, quando H_0 é rejeitada diz-se que a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa. O poder de eficiência de uma prova estatística é, portanto, a probabilidade de rejeitar H_0 quando H_0 é realmente falsa¹⁹.

Os testes não-paramétricos para amostras independentes são os mais adequados ao tipo de resultados por nós obtidos. As afirmações decorrentes das provas não-paramétricas são independentes da forma de distribuição da população da qual se extraiu a amostra aleatória. Além disso, estas provas, permitem a comparação entre grupos com número de amostras diferentes e/ou pequenos. São testes de significância livres do tipo da distribuição^{126,175}.

Sendo assim, formuladas as hipóteses de nulidade e a alternativa e escolhida a prova adequada, a etapa seguinte consiste em especificar o nível de significância. Escolheu-se o de 0,05, valor comumente usado em resultados de análise química que aceita em cada 20 determinações uma com erro analítico¹⁹.

Em outras palavras, pode-se decidir se as diferenças encontradas entre os resultados da determinação da COHb são decorrentes apenas de erros experimentais ou da exposição ao monóxido de carbono.

A comparação da carboxiemoglobinemia entre fumantes e não-fumantes de cada grupo, avaliada pelo teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov ao nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$), apresentou diferença significativa em todos os grupos (**tabela XXXIV**). Quando o valor do parâmetro estatístico $D_{\text{encontrado}}$ supera o valor D_{limite} , a hipótese de nulidade é rejeitada. Nesta comparação foram usados apenas os resultados obtidos no final da jornada de trabalho.

Tabela XXXIV - Parâmetros estatísticos (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov obtidos na comparação entre a carboxiemoglobinemia entre fumantes e não-fumantes dos grupos expostos e controle.

grupo	parâmetro estatístico (D)	
	D_{limite}	$D_{\text{encontrado}}$
controle	0,35	0,96*
exposto		
I _a	0,37	0,62*
I _b -	0,63	0,86*
I _c	0,33	0,80*
II	0,35	0,53*

(*) diferença significativa ($\alpha=0,05$)

Considerando-se H_0 como a igualdade entre a carboxiemoglobinemia, em fumantes e não-fumantes, a sua rejeição significa que os grupos comparados são diferentes em função do hábito de fumar.

Na tentativa de se avaliar apenas a exposição ao CO do ambiente de trabalho, foi solicitado aos indivíduos do primeiro grupo avaliado (subgrupo I_a) que não fumassem no período de trabalho no dia da amostragem, sendo esta realizada no início (i) e no final (f) da jornada.

Em alguns casos, a diferença entre os resultados obtidos nas amostras (f - i) foi negativa, o que provavelmente se deve a que estes indivíduos, estando

expostos a níveis muito baixos de CO e não tendo fumado durante a jornada de trabalho, passassem a eliminar o xenobiótico (tabela XXV). Resultados negativos também foram encontrados nos indivíduos do subgrupo I_b (tabela XXVII).

Para tentar correlacionar o hábito de fumar na carboxiemoglobinemia, foi questionado aos trabalhadores a marca e o número médio de cigarros fumados por dia. Pelos resultados obtidos no grupo controle e nos grupos I e II pode-se concluir que não houve correlação direta entre as % de COHb e o número de cigarros consumidos pelos indivíduos (**figura 24**). Este fato, também confirmado por vários autores^{7,32,88,92,173}, está relacionado às características próprias de cada indivíduo no ato de fumar, como frequência, duração e profundidade da tragada, além das diferenças na composição do cigarro entre as marcas.

Figura 24 - Correlação entre a carboxiemoglobinemia (%COHb) e o número médio de cigarros consumidos por dia, em fumantes do grupo controle e expostos ocupacionalmente ao CO (grupos I e II).

O número de cigarros consumidos por dia, obtido por resposta verbal do indivíduo, é geralmente calculado pela média de cigarros consumidos por semana, apresentando portanto a tendência ao arredondamento para 5, 10, 15 ou 20 cigarros. Na tentativa de se obter informações mais precisas, foi também questionado aos trabalhadores do grupo II quantos cigarros eles tinham fumado naquele dia, até o momento da colheita da amostra de sangue.

Mesmo assim, considerando a resposta mais exata por ser obtida pela memorização do ocorrido no dia, não foi encontrada correlação significativa entre este hábito e a carboxiemoglobulinemia (**figura 25**).

Figura 25 - Correlação entre a carboxiemoglobulinemia (%COHb) e o número médio de cigarros consumidos no dia (consumo até o momento da colheita da amostra), em fumantes expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono (grupo II).

O teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado também na comparação entre os indivíduos expostos e os do grupo controle, tomando-se inicialmente os grupos como um todo e, em seguida, distinguindo os fumantes de não-fumantes (**tabela XXXV**).

Tabela XXXV - Parâmetros estatísticos (D) do teste de Kolmogorov-Smirnov obtidos na comparação entre a carboxiemoglobinemia em indivíduos do grupo controle e dos grupos expostos (I_{a,b,c} e II)

comparação	parâmetro estatístico (D)	
	D _{limite}	D _{encontrado}
fumantes e não-fumantes		
controle x I	0,23	0,24*
controle x I ^a	0,33	0,53*
controle x I ^b	0,21	0,18
controle x I ^c	0,22	0,74*
fumantes		
controle x I	0,39	0,35
controle x I ^a	0,60	0,18
controle x I ^b	0,40	0,14
controle x I ^c	0,40	0,60*
não-fumantes		
controle x I	0,32	0,13
controle x I ^a	0,39	0,64*
controle x I ^b	0,26	0,03
controle x I ^c	0,29	0,89*

(*) diferença significativa ($\alpha = 0,05$)

Sem a distinção do hábito de fumar, a diferença foi estatisticamente significativa para todos os grupos, exceto no subgrupo Ic, o que se deve, provavelmente, aos baixos teores de COHb deste subgrupo.

Com a distinção entre fumantes e não-fumantes, observa-se que as diferenças em relação aos respectivos grupos controles foram significativas para os grupos II (fumantes e não-fumantes) e subgrupo Ib (não-fumantes), indicando que nestes grupos houve exposição ocupacional significativa ao CO.

A comparação entre as diferenças dos parâmetros $D_{\text{encontrado}} - D_{\text{limite}}$ no grupo II mostra uma diferença maior para os não-fumantes, pelo fato da carboxiemoglobinemia em fumantes já estar em nível superior à dos não-fumantes antes da exposição ocupacional.

Desta forma, para o uso da carboxiemoglobinemia como indicador

biológico de exposição ao CO há necessidade de se distinguir fumantes de não-fumantes, sem o que a interpretação dos níveis encontrados poderá ser errônea.

A legislação vigente no Brasil²⁷ estabelece para a exposição ao CO o Limite de Tolerância Biológico (LTB) para a carboxiemoglobinememia em 5% para indivíduos não-fumantes.

Considerando-se os não-fumantes, nenhum do grupo controle (n=80) apresentou teores superiores ao LTB, enquanto que, em todos os grupos expostos, 13 apresentaram valores superiores, o que representa 12% do total dos indivíduos (n=109) e 37% dos do grupo II (n=30).

O incremento da carboxiemoglobinememia durante a exposição ocupacional, obtida pela diferença entre os valores das amostras colhidas no final e no início da jornada (subgrupo Ia e Ib) não superou o valor de 5% em nenhum dos trabalhadores (n=41).

Considerando o padrão de segurança de 5% de COHb pode-se inferir aos fumantes maior probabilidade de apresentar efeitos nocivos devido à exposição ocupacional ao CO. Na população estudada de fumantes obteve-se, em % de resultados superiores a 5% , em cada grupo, o seguinte quadro:

grupo controle (n=19)	5%
grupo exposto	
Ia (n=34)	18%
Ib (n=7)	30%
Ic (n=30)	37%
II (n=29)	93%

Estes resultados são de importância na avaliação da condição de saúde do trabalhador, que deve ser vista como um todo, independentemente de fonte de exposição ao xenobiótico, e não devem ser negligenciados, mesmo que o valor de até 6,5% seja tido pela Legislação Brasileira como valor *normal* para fumantes.

Não sendo possível realizar a monitorização ambiental, o conhecimento dos processos industriais e o detalhamento das operações auxiliaram

o reconhecimento da exposição dos trabalhadores ao monóxido de carbono.

Teve-se acesso aos resultados de avaliação ambiental (pelo uso de tubos detectores por colorimetria) realizada em período não coincidente ao dia da amostragem do sangue em dois locais. Em um deles (subgrupo Ia) os resultados correspondem à avaliação de 5 dias consecutivos, em 15 locais diferentes, 3 a 4 vezes por dia, fornecendo um valor médio de 4 ppm ($n=270$). No outro (grupo II), foram feitas 6 determinações em diferentes locais sendo encontrados níveis entre 20 e 100 ppm.

Não foi possível correlacionar diretamente, os teores de COHb às avaliações ambientais por estas não terem sido concomitantes à monitorização biológica. Mesmo assim, pode-se observar que tanto os baixos níveis de COHb encontrados nos indivíduos do subgrupo Ia como os níveis mais elevados nos do grupo II são coerentes com os dados da avaliação ambiental.

O estudo do método apresentado foi feito visando sua aplicação à monitorização biológica da exposição ocupacional ao CO. Entretanto, suas características permitem supor que a mesma técnica possa ser utilizada com outras finalidades, como no diagnóstico de intoxicações fatais, em estudos comparativos de carboxiemoglobulinemia materna e fetal e na monitorização biológica da exposição ao diclorometano, entre outras.

7. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais do presente trabalho permitem concluir que:

- o método espectrofotométrico otimizado para a determinação da carboxiemoglobinemia mostrou-se sensível, preciso, rápido e simples, podendo ser usado na monitorização biológica da exposição ocupacional ao monóxido de carbono;
- o método apresenta precisão dependente da concentração e os coeficientes de variação obtidos permitem estabelecer sua sensibilidade em 0,50% de carboxiemoglobina;
- a determinação de fatores de correção específicos para o espectrofotômetro é necessária à obtenção de resultados confiáveis;
- o monóxido de carbono obtido por reação química pode substituir o de cilindro de gás comprimido (puro) na preparação da solução 100% de carboxiemoglobina;
- o deslocamento do monóxido de carbono dissolvido na solução de 100% de carboxiemoglobina pelo nitrogênio é imprescindível na preparação de diferentes concentrações de carboxiemoglobina;
- a carboxiemoglobina é estável em amostra de sangue armazenada à temperatura de 4 a 8 °C por, no mínimo, oito dias (*teste t de Student*; $\alpha = 0,01$);
- o conteúdo hemoglobínico e a opalescência (lipemia) da amostra de sangue não interferem na quantificação espectrofotométrica da carboxiemoglobina;

- os trabalhadores dos três grupos de indivíduos expostos ao monóxido de carbono, em fornos de fundição, apresentaram baixos teores de carboxiemoglobina, indicando uma baixa exposição nestes locais de trabalho; um destes grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle (teste de *Kolmogorov-Smirnov*; $\alpha = 0,05$);
- o grupo de indivíduos que trabalham na regulação de motores de combustão interna, apresentaram teores de carboxiemoglobina que indicam exposição acentuada ao monóxido de carbono no local de trabalho (37% dos indivíduos não-fumantes com teores superiores a 5% de carboxiemoglobina); a diferença entre este grupo e o grupo controle foi estatisticamente significativa (teste de *Kolmogorov-Smirnov*; $\alpha = 0,05$).
- os fumantes apresentaram diferença estatisticamente significativa nos níveis de carboxiemoglobinemia quando comparados aos não-fumantes (teste de *Kolmogorov-Smirnov*; $\alpha = 0,05$); esta diferença é evidenciada em indivíduos do grupo controle e minimizada nos grupos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ADAIR, G.S. The hemoglobin system. VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin, **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **63**:529-45, 1925.
2. AITIO, A. & JARVISALO, J. Collection, processing and storage of specimens for binological monitoring of occupational exposure to toxic chemical. **Pure Appl. Chem.**, London, **56**(4): 549-66, 1984.
3. AMDUR, M.O.; Air pollutants. In; AMDUR, M.D.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D.; eds. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poison**. 4 ed. New York, Pergamon Press, 1991. p.868-70.
4. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS **Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices**. 5. ed. Cincinnati, 1986. BEI vii (88)-BEI xxii(88)
5. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS - **Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices**. 5 ed., Cincinnati, 1986 p.106-7
6. ANDERSEN, O.S.; PETERSEN, B.N.; REM, J. - Hemoglobin pigments. Spectrophometric determination of oxi-, carboxy-, and sulphhemoglobin in capillary blood. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, **42**: 85-100, 1972.
7. ANGENOT, L. - Composition chimique de la fumée de tabac. **J. Pharm. Belg.**, Bruxelles, **38** (3): 171-80, 1983.
8. ANTHONY, D.C. & GRAHAM, D.G. - Toxic responses of the central nervous system - In; AMDUR, M.D.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D.; eds. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poison**. 4 ed. New York, Pergamon Press, 1991. p.4070-9.
9. ARIENS, E.J.; LEHMANN, P.A.; SIMONIS, A.M. **Introduction a la toxicologia general**. México, Diana, 1973. 337p.
10. ATHERLEY, G. A critical review of time-weighted average as an index of exposure and dose, and of its key elements. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, **46**(9): 481-7, 1985.
11. ATKINS, E.H. & BAKER, E.L. Exacerbation of coronary artery disease by occupational carbon monoxide exposure: A report of two fatalities and a review of the literature. **Am. J. Ind. Med.**, Chicago, **7**(1): 73-9, 1985.
12. AYRES, S.M.; GIANNELLI Jr., S.; MUELLER, H. Carboxyhemoglobin and the access to oxygen. **Arch. Environ. Health**, Chicago, **26**(1): 8-15, 1973.
13. BARCROFT, J. **In the respiratory function of the blood**, Cambridge 1928. Cambridge University Press. Apud: DICERA, E.; DOYLE, M.L.; CONNELLY, P.R.; GILL S.J., - Carbon monoxide binding to human hemoglobin A₀. **Biochemistry**, Washington, **26**(20): 6494-502, 1987.

* De acordo com a norma NB 66/78 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), Columbus, 1990.

14. BARETTA, E.D.; STEWART, R.D.; GRAFF S.A.; DONAHOO, K.K. Methods developed for the mass sampling analysis of CO and carboxyhemoglobin in man. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, **39**(3): 202-9, 1978
15. BARNARD, R.J. & WEBER, J.S. Carbon monoxide: A hazard to fire fighters. *Arch. Environ. Health*, Chicago, **34**(4): 255-7, 1979.
16. BASELT, R.C. **Biological monitoring methods for industrial chemical**. Davis, Biomedical Publications, 1980. p.68-71.
17. BASELT, R.C. **Analytical procedures for therapeutic drug monitoring and emergency toxicology**. Davis, Biomedical Publications, 1980. p.64-7.
18. BERLIN, A.; WOLFF, A.H. ; HASEGAWA, Y., eds. **The use of biological specimens for the assesment of human exposure to environmental pollutants**. London, Martinus Nijhoff, Publishers ,1979. p.3-7 [Proceedings of the Internacional Workshop at Luxemburg, 18-22 April 1977]
19. BERQUÊ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**, São Paulo, Pedagógica, 1981. 350p.
20. BEUTLER, E. & WEST, C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, **30** (6):871-4, 1984.
21. BEUTLER, E. - Metemoglobinemia e sulfemoglobinemia. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES, R.W., eds., **Hematologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p.332-4.
22. BISHOP, G.A.& GILL, S.J. The carbon-oxygen partition coefficient of isolated alpha and beta chains from hemoglobin A₀, *Biopolymers*, New York, **25**: 1381-4, 1986.
23. BLACKMORE, D.J. The determination of carbon monoxide in blood and tissue. *Analyst*, London, **95**(1130):439-58, 1970.
24. BORLAND, C.; HARMES, K.; CRACKNELL, N.; MACK, D.; HIGENBOTTAM, T. Methemoglobin levels in smoker and non-smoker. *Arch. Environ. Health*, Chicago, **40**(6): 330-3, 1985.
25. BRASIL, Leis, Decretos, etc. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, 17 jun. 1986. Seção I, p.8792 [Resolução nº. 18, 06 maio 1986].
26. BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança, Higiene e Medicina do Trabalho. NR-7 - Atividades insalubres. In: _____. Segurança e medicina do trabalho: Lei nº 6514, de 22 de dezembro de 1977, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria nº. 3214, de 8 de junho de 1978. 18.ed. São Paulo, Atlas, 1990. p.69-76 [Manuais de legislação atlas, 16].
27. BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança, Higiene e Medicina do Trabalho. NR-15 - Atividades insalubres. In: _____. Segurança e medicina do trabalho: Lei nº 6514, de 22 de dezembro de 1977, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria nº. 3214, de 8 de junho de 1978. 18.ed. São Paulo, Atlas, 1990. p.94-189 [Manuais de legislação atlas, 16].

28. BRUNN, I.O.; CAMPBELL, J.S.; HUIZEL, R.L. Evaluation of occupational exposures: A proposed sampling method. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 47(4): 229-35, 1986.
29. BUCHWALD, H. A rapid and sensitive method for estimating carbon monoxide in blood and its application in problem areas. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 30(1): 564-9, 1969.
30. BURGESS, W.A. **Recognition of health hazards in industry: a review of materials and processes.** New York, Wiley, 1981. 275p.
31. CASTELLINO, N. & SANNOLO, N. I legami dell'ossido di carbonio con le emoproteine intra ed extracellolari. Ruolo della Hb e meccanismi di tossicità del CO. *Arch. Sci. Lav.*, Roma, 3: 29-58, 1987.
32. CASTELLINO, N. & SANNOLO, N. Monitoraggio biologico dell'esposizione professionale al CO: proposta di classi di rischio. *Med. Lav.*, Milano, p.119-31.
33. CHACE, D.H.; GOLDBAUM, L.R.; LAPPAS, N.T. Factors affecting the loss of carbon monoxide from stored blood samples. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, 10(5): 181-9, 1986.
34. CHECKOWAY, H.; DEMENT, J.M.; FOWLER, D.P.; HARRIS, R.L.; LAMM, S.H.; SMITH, T.J. Industrial hygiene involvement in occupational epidemiology. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 48(6): 515-23, 1987.
35. CHERNOFF, A.I. The human hemoglobin in health and disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, 253(8): 322-31, 1955.
36. CHIA, K.S.; JEYARATNAM J.; CHAN, T.B.; LIM, T.K. Airway responsiveness of firefighters after smoke exposure. *Br. J. Ind. Med.*, London, 47(): 524-527, 1990.
37. CINKOTAI, F.F. & THOMSON, M.L. Diurnal variation in pulmonary diffusing capacity for carbon monoxide. *J. Appl. Physiol.*, Bethesda, 21(2): 539-42, 1966.
38. COBURN, R.F.; DANIELSON, G.K.; BLAKEMORE, W.S.; FORSTER II, R.E. Carbon monoxide in blood: analytical method and sources of error. *J. Appl. Physiol.*, Bethesda, 19(3): 510-5, 1964.
39. COBURN, R.F.; FORSTER, R.E.; KANE, P.B. Considerations of the physiological variables that determine the blood carboxyhemoglobin concentration in man. *J. Clin. Invest.*, New York, 44(11): 1899-910, 1965.
40. COBURN, R.F.; PLOEGMAKERS, F.; GONDRIE, P.; ABBOUD, R., Myocardial myoglobin oxygen tension, *Am. J. Physiol.*, Bethesda, 224:870-6, 1973.
41. COLLISON, H.A.; RODKEY, F.L.; O'NEAL, J. Determination of carbon monoxide in blood by gas chromatography. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, 14(2): 162-71, 1968.

42. COLOMBI, A.; BURATTI, M.; ZOCCHETTI, C; IMBRIANI, M.; GHITTORI, S. Limiti Biologici di Esposizione: evoluzione dei criteri interpretativi e metodologici. **Med. Lav.**, Milano, **80**(1): 25-42, 1989
43. COMMINS, B.T. & LAWTHOR, P.J. A sensitive method for the determination of carboxyhemoglobin in a finger prick sample of blood. **Br. J. Ind. Med.** London, **22**:139-43, 1965.
44. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Relatório de qualidade do ar na região metropolitana de São Paulo e em Cubatão.** São Paulo, 1988. p. 2-59.
45. CONSTANTINO, A.G.; PAR, J.; CAPLAN, Y.H. Carbon monoxide analysis: A comparison of two CO-oximeters and headspace gas chromatography. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, **10**(5): 190-3, 1986.
46. COOPER, D.Y.; LEVIN, S.; NARASIMHULU, S.; ROSENTHAL, O. Photochemical action spectrum of the termical oxidase of mixed function oxidase systems., **Science**, Washington, **147**:400-2, 1965.
47. CURPHEY, T.J.; HOOD, L.P.L.; PERKINS, N.M. Carboxihemoglobin in relation to air pollution and smoking. **Arch. Environ. Health**, Chicago, **10**:179-85, 1965.
48. DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Hematologia prática**, 2.ed. Barcelona, Toray, 1974. p.45.
49. DAHMS, E.T. & HORVATH, S.M. Rapid, accurate technique for determination of carbon monoxide in blood. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, **20**(5): 533-7, 1974.
50. DALZIEL, K. & O'BRIEN, J.R.P. Side reactions in the deoxygenation of dilute oxxhaemoglobin solutions by sodium dithionite. **Biochem. J.**, London, **67**:119-23, 1957.
51. DALZIEL, K. & O'BRIEN, J.R.P. Spectrokinetic studies of the reaction of hydrogen peroxide with haemoglobin in dithionite solutions. **Biochem. J.**, London, **67**: 124-36, 1957.
52. DAVIES, D.M.; JOLLY, E.J.; PETHYBRIDGE, R.J.; COLQUHOUN, W.P. The effects of continuous exposure to carbon monoxide on auditory vigilance in man. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, **48**(1): 25-34, 1981.
53. DENNIS, R.C. & VALERI, C.R. Measuring percent oxygen saturation of hemoglobin, percent carboxyhemoglobin and methemoglobin, and concentration of total hemoglobin and oxygen in blood of man, dog and baboon. **Clin. Chem.**, New York, **26**(9): 1304-8, 1980.
54. DI CERA, E.; DOYLE, M.L.; CONNELLY, P.R.; GILL S.J. Carbon monoxide binding to human hemoglobin A₀. **biochemistry**, Washington, **26**(20): 6494-502, 1987.
55. DI CERA, E.; DOYLE, M.L.; MORGAN, M.S.; De CRISTOFARO, R.; LANDOLFI, R.; BIZZI, B; CASTAGNOLA, M.; GILL, S.J. Carbon monoxide and oxygen binding to human hemoglobin A₀. **Biochemistry**, Washington, **28**(6): 2631-8, 1989.

56. DIJKHUIZEN, P.; BUURSMA, A.; GERDING, A.M.; VAN KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.G. Carboxyhaemoglobin. Spectrophotometric determination tested and calibrated using a new reference method for measuring carbon monoxide in blood. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, **80**(1): 95-104, 1977.
57. DIJKHUIZEN, P.; BUURSMA, A.; GERDING, A.M.; ZIJLSTRA, W.G. Sulfhaemoglobin: absorption spectrum, millimolar extinction coefficient at $\lambda = 620$ nm, and interference with the determination of haemoglobin and of haemoglobincyanide. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, **78**(3): 479-87, 1977.
58. DOMINGUEZ, A.M.; CHRISTENSEN, H.E.; GOLDBAUM, L.R.; STEMBRIDGE, V.A. A sensitive procedure for determining carbon monoxide in blood or tissue utilizing gas-solid chromatography. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, **1**(2): 135-43, 1959.
59. DRAGERWERK. AG. **Detector tube handbook**, 2.ed., LUBECK, 1973. p.46-55 [manual].
60. DROZ, P.O. & GUILLEMIN, M.P. Occupational exposure monitoring using breath analysis. **J. Occup. Med.**, Chicago, **28**(8): 593-601, 1986
61. DUBOWSKI, K.M. Breath analysis as a technique in clinical chemistry. **Clin. Chem.**, Winstom-Salem, **20**(8): 966-72, 1974.
62. EDLING, C. & AXELSON, O. Risk factors coronary heart disease among personnel in a bus company. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, **54**(2): 181-3, 1984.
63. ELINDER, C.G. & VESTERBERG, D. Environmental and biological monitoring. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, **11** (supl 1): 91-103, 1985.
64. ESTES, E.D. & HARDISON, D.L. Evaluation of reference methods for measurement of carbon monoxide emissions at refineries. **Anal. Chem.**, Washington, **58**(4): 945-50, 1986.
65. FAGGIANO, C. Contaminação pelo monóxido de carbono. **Ita Eng.**, São José dos Campos, **2**(5): 34-7, 1971.
66. FENTON, J. Artifact due to races of detergent on laboratory glassware affecting carboxyhaemoglobin measurement. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, **39**(1): 266-8, 1972
67. FOGH-ANDERSEN, N.; ERIKSEN, P.S.; GRINSTED, J.; SIGGAARD-ANDDRSEN, O. Gas-chromatographic measurement of carboxyhemoglobin in blood from mothers and newborns. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, **34**(1): 24-6, 1988.
68. FORBES, W.H. ; SARGENT, F. ; ROUGHTON, F.J.W. - The rate of carbon monoxide uptake by normal men. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, **143**:594-608. 1945.

69. FORSTER, R.E. Reactions of carbon monoxide with heme proteins p.10-13. In: Effects of chronic exposure to low levels of carbon monoxide on human health behavior and performance. , DUBOIS, A.B. ed., National Academy of Sciences and National Academy of Engineering, Washington, D.C., 1969a. Apud: MINISTER OF NATIONAL HEALTH AND WELFARE - **Carbon monoxide**, Ottawa, 1983. [83-EHD-85].
70. FRANZINELLI, A.; ROSSI, M.; BARNABÉ, R. Valutazione indiretta della carbossemoglobinemia. Verifica di una metodica semplice e rapida. **Med. Lav.**, Milano, **74**: 57-60, 1983
71. FRINGS, C.S.; FENDLEY, T.W.; DUNN, R.T.; QUEEN C.A. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, **18**(7): 673-4, 1972.
72. GIBSON Q.H. The oxygenation of hemoglobin. In: DOLPHIN, D., ed. **The Porphyrins**. New York, Academic Press, 1978. v.5, p.153-63.
73. GILL, S.J.; Di CERA, E.; DOYLE, M.L.; BISHOP, G.A.; ROBERT, C.H. Oxygen binding constants for human hemoglobin tetramers, **Biochemistry** , Washington, **26**:3995-4002, 1987.
74. GODIN, G. & SHEPHARD, R.J. On the course of carbon monoxide uptake and release. **Respiration**, Basel, **29**:317-29. 1972.
75. GOLDBAUM, L.R.; CHACE, D.H.; LAPPAS, N.T. - Determination of carbon monoxide in blood by gas chromatography using a thermal conductivity detector. **J. Forensic Sci.**, Chicago, **31**(1): 133-42, 1986.
76. GOLDSMITH, J.R.; TERZAGHI, J.; HACKNEY, J.D. Evaluation of fluctuating carbon monoxide exposure. **Arch. Environ. Health**, Chicago, **7**:33-49, 1963
77. GONÇALVES, E. P. **Espectrofotometria UV- Visível** São Paulo - Intralab,s.d. v.2, p.1093-6 (Manual do aparelho DMS - 80).
78. GONÇALVES, M.L.S.S. **Métodos instrumentais para análise de soluções, análise quantitativa**. Lisboa, Gulbenkian, 1983. p.13-82.
79. GROTH, R.H.; DOYLE, T.B.; KAHN, M.D. Effect of diluent gas on gas chromatographic analysis of methane using a flame ionization detector. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, **8**(6): 359-60, 1970.
80. GUATELLI M. A. **Intoxicacion oxicarbonada: estudio bioquímico y metodología analítica**. Buenos Aires, Euder, 1971. p.83-9.
81. GUILLERM, R.; BADRÉ, R.; HÉE, J.; MASUREL, G. Composition de la fumée de tabac: analyse des facteurs de nuisance. **Rev. Tuberc.**, Paris, **36**(2): 187-208, 1972.
82. HALDANE, J. & DOUGLAS, C.G. The laws of combination of haemoglobin with carbon monoxide and oxygen, **J. Physiol.**, London, **44**: 275-304, 1912
83. HALDANE, J. & SMITH, J.L. - The absorption of oxygen by the lungs, **J. Physiol.**, London, **22**: 231-58, 1897.

84. HALDANE, J.S. & PRIESLEY, B.A. The regulation of lung ventilation *J. Physiol.*, London, **32**:225-66, 1905. Apud: WILSON, H.K. *Breath analysis; Physicological basis and sampling techniques. Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, **12**: 174-92, 1986.
85. HAMILTON, A. & HARDY, H.L. *Industrial toxicology*, 3.ed., Massachusetts, Publishing Sciences Group, 1974.p.239-58.
86. HANIG, J.P. & HERMAN, E.H. - Toxic responses of the heart and vascular systems In; AMDUR, M.D.; DOULL, J.;KLAASSEN, C.D.;, eds. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poison*. 4 ed. New York, Pergamon Press, 1991. p.430-454.
87. HATCH, T.F. Significant dimensiond of the dose-response relationship. *Arch Environ. Health*, Chicago, **16**: 571-578, 1968.
88. HAWKINS, L.H. Blood carbon monoxide levels as a function of daily cigarette consumption and physical activity. *Br. J. Ind. Med.*, London, **33**(2): 123-5, 1976.
89. HECKERLING, P.S.; LEIKIN, J.B.; TERZIAN, C.G.; MATUREN, A. Occult carbon monoxide poisoning in patients with neurologic illness. *Clin. Toxicol.*, New York, **28**(1), 29-44, 1990.
90. HEGESH, E.; GRUENER, N.; COHEN, S.; BOCHKOVSKY, R.; SHUVAL, H.I. A senshtive micromethod for the fdetermination of methemoglobin in blood. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, **30**: 679-82, 1970
91. HEITBRINK, W.A. & CROUSE, W.E. Application of industrial Hygiene air sampling data to the evaluation of controls for air contaminants. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, **45**(11): 773-7, 1984.
92. HESSEL. D.W. & MODGLIN, F.R. The determination of carbon monoxide in blood by gas-solid chromatography. *J. Forensic Sci.*, Chicago, **12**(1): 123-30, 1967.
93. HEYNDRICKI, A.; SCHEIRIS, Ch.; VERCROYSE, A.; OKKERSE, E. Gas chromatographic determination of carbon monoxide in blood and the hyperbaric oxygen treatment in carbon monoxide poisoning gases. *J. Pharm. Belg.*, Bruxelles, **25**(3): 247-58, 1970
94. HLASTALA, M.P.; McKENNA, H.P.; FRANADA, R.L. & DETTER, J.C. The ifluence of carbon monoxide on hemoglobin-oxygenbinding *J. Appl. Physiol.*,Bethesda, **41**(6):893-899, 1976.
95. HOXTER, G. *Calibração isosbética*. São Paulo, 1977. p. 97-100. [Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
96. HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K.; SORSA, M.; ENGSTROM, K.; WINISTO, P. Passivé smoking at work: biochemical and biological measures of exposure to environmental tobacco smoke. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, **59**(4): 337-45, 1987.
97. JABARA, J.W.; KEEFE, T.J.; BEAULIEU, H.J. Carbon monoxide: dosimetry in occupational exposures in Denver, Colorado, *Arch. Environ. Health*, Chicago, **35**(4): 198-204, 1980.

98. KARNIK, A.S. & COIN, E.J. Carbon monoxide kinetics following simulated cigarette smoking. **Arch. Environ. Health**, Chicago, **35**(3): 146-7, 1980.
99. KATSUMATA, Y.; AOKI, M.; SATO, K.; SUZUHI, O.; OYA, M.; YADA, S. A simple spectrophotometry for determination of carboxihemoglobin in blood. **J. Forensic Sci.**, Chicago, **27**(4): 928-34, 1982.
100. KELMAN, G.R. & DAVIES, T.J. Carboxyhaemoglobin levels in workers in Leicestershire garages. **Br. J. Ind. Med.**, London, **36**(3): 238-41, 1979.
101. KIT, S.N.V. - **Determinação de teores de carboxihemoglobina pela técnica espectrofotométrica**, São Paulo, 1980. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP].
102. KLEINMANN, M.T.; DAVIDSON, D.M.; VANDAGRIFF, R.B; CAIOZZO, V.J.; WHITTENBERGER, J.L. Effects of short-Term Exposure to Carbon Monoxide in Subject with Coronary Artery Disease. **Arch. Environ. Health**, Chicago, **44**(6): 361-9, 1989.
103. KLENDSHOJ, N.C.; FELDSTEIN, M.; SPRAGUE, A.L. The spectrophotometric determination of carbon monoxide. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **183**(1): 297-303, 1950.
104. KURPPA K. & RANTANEN, I. Carbon monoxide. In: PARMEGGIANI, L., **Encyclopedia of occupational health and safety**. 3. ed. Genebra, International Labour Office, 1983. p. 395-9.
105. KURPPA, K.; KIVISTO, H.; VAINIO, H. Dicloromethane and carbon monoxide inhalation: carboxyhemoglobin addition, and drug metabolizing enzymes in rat. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, **49** (1): 83-7, 1981.
106. LAMBERTSEN, C.J. Respiração In: MOUNTCASTLE, V. B. **Fisiologia médica**, 13.ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. v.2, p.1364-606.
107. LAMBETH, D.O. & PALMER, G. The kinetics and mechanism of reduction of electron transfer proteins and other compounds of biological interest by dithionite, **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **218**(7): 6095 - 103, 1973
108. LAUWERYS, R. & BERNARD, A. La surveillance biologique de l'exposition aux toxiques industriels: position actuelle et perspectives de développement. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, **11**(3): 155-64, 1985.
109. LAUWERYS, R. - Biological criteria for selected industrial toxic chemicals: a review. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, **1**: 139-72, 1975.
110. LAUWERYS, R. - **Individual chemical exposure guidelines for biological monitoring**. Paris, Biomedical, 1983. p.1-8.
111. LAUWERYS, R.; - Occupational toxicology. In: AMDUR, M.D.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D.; eds. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poison**. 4 ed. New York, Pergamon Press, 1991. p.947-53.
112. LAUWERYS, R.R. **Industrial chemical exposure : guidelines for biological monitoring**. Davis, Biomedical Publications, 1983. p.112-4, 140-1.

113. LEHNINGER, A.L. **Principios of biochemistry**, New York, Worth, 1982. p.169-206
114. LILIENTHAL, J.L. & PINE, M.B. The effect of oxygen pressure on the uptake of carbon monoxide by man at sea level and at altitude, **Am. J. Physiol.**, Bethesda, **145**:346-50, 1946.
115. LILY, R.E.C.; COLE, P.V.; HAWKINS, L.H. Spectrophotometric measurement of carboxyhaemoglobin. **Br. J. Ind. Med.**, London, **29**:454-7, 1972.
116. LINCH, A.L. **Biological monitoring for industrial chemical exposure control**. Cleveland, CRC, 1974. p. 62-72.
117. MAGNIER, M; ROMARY, F.; FONTAINE M.M. Physiologie-rythme circadien de l'action de l'oxide de carbone sur l'émission du gaz carbonique par le Rat en groupe. **C.R. Seances Acad. Sci. Sér. D**, Paris, **276**: 1009-12, 1973.
118. MALENFANT, A.L.; GAMBINO, S.R.; WARAKSA, A.J.; ROE, E.I. Espectrophotometric determination of hemoglobin concentration and percent oxyhemoglobin and carboxyhemoglobin saturation. **Clin Chem.**, Winston-Salen, **14**(8): 789, 1968.
119. MALORNY, G., MÜLLER-PLATHE, O; YSTRAUB, M. [alteración del equilibrio acido-básico em la intoxicación aguda por monóxido de carbono y efectos del oxígeno o de las combinaciones de dióxido de carbono y oxígeno]. **Naunyn-Schmieddberg's Arch. Exp. Pathol Pharmacol.**, Berlin, **243**:439-58, 1962.
120. MANOLIS, A. The Diagnostic potencial of breath analysis, **Clin. Chem.**, Winston Salem, **29**(1):5-15, 1983.
121. MARTIN, A.E. Difference and derivative spectra. **Nature**, London, **180**(4579): 231-3, 1957.
122. McCONNAUGHEY, P.W.; McKEE, E.S.; PRITTS, I.M. Passive colorimetric dosimeter tubes for ammonia, carbon monoxide, carbon dioxide, hydrogen sulfide, nitrogen dioxide and slfur dioxide. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, **46**(7): 356-62, 1985.
123. McGILVERY, R.W. **Biochemistry : a functional approach**. 2.ed. Philadelphia, Saunders, 1979. p. 228-52.
124. MERRICK, M.F. & PARDUE, H.L. Evaluation of absorption and first-and second-derivative spectra for simultaneous quantification of bilirubin and hemoglobin. **Clin Chem.**, Winston-Salem, **32**(4): 598-602, 1986.
125. MIHEVIC, P.M.; GLINER, J.A.; HORVATH, S.M. Carbon monoxide exposure and information precessing during perceptual-motor performance. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, **51**(4): 355-63, 1983.
126. MILLER, J.C. & MILLER, J.N., eds. **Statistics for analytical chemistry**. 2.ed. Chichester, Ellis Horwood, 1988. 225p.
127. MINISTER OF NATIONAL HEALTH AND WELFARE **Carbon monoxide**, Ottawa, 1983. [83-EHD-85].

128. MOFFAT, K.; DEATHERAGE, J.F.; SEYBERT, D.W. A Structural Model for the Kinetic Behavior of Hemoglobin. *Science*, Washington, **206**(30): 1035-41, 1979.
129. MORAES, E.C.F.; SZNELWAR, R.; FERN CULA, N.A.G.G. *Manual de Toxicologia Analítica*, São Paulo, Roca, 1990. p.37-41.
130. MUMPOWER, R.C; LEWIS, J.S.; TOVEY, G.P. Determination of carbon monoxide in cigarette smoke by gas chromatography. *Tobac Sci.*, New York, **6**:142-145, 1962. Apud: MINISTER OF NATIONAL HEALTH AND WELFARE - *Carbon monoxide*, Ottawa, 1983. [83-EHD-85].
131. MURAMATSU, T.; WEBER, A.; MURAMATSU, S.; AKERMANN, F. An experimental study on irritation and annouance due to passive smoking. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, **51**(4): 305-17, 1983.
132. NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH *Criteria for a recommended standard ... occupational exposure to carbon monoxide*, Washington, 1972.
133. NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH *Carbon monoxide in blood.: physical and chemical analysis branch analytical* p.113:1 - 113:5.
134. OCAK, A.; VALENTOUR, J.C.; BLAKE, R.V. The effects of storage conditions on the stability of carbon monoxide in postmorten blood. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, **9**(5): 202-6, 1985.
135. OKADA, Y.; TYUMA, I.; UEDA, Y. ; SUGIMOTO, T. , Effect of carbon monoxide equilibrium between oxygen and hemoglobin *Am. J. Physiol.*, Bethesda, **230**:471-75, 1976.
136. OKL, H. *Os perigos do gás contendo monóxido de carbono*, João Momlevade, C.S.B.M. Divisão Siderurgia IM/SETCCF, 1980. [Semana de Segurança da CST].
137. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD - *Monoxido de carbono*. México, 1980.[Criterios de Salud Ambiental, n. 13].
138. PACE, N.; CONSOLAZIO, W.V.; WHITE, W.A. ; BEHNKE, A.R. Formulation of the principal factores affecting the rate of uptake of carbon monoxide by man. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, **147**, 352-59, 1946.
139. PARK, C.M. & NAGEL, R.L. Sulfhemoglobinemia clinical and molecular aspects. *N. Engl. J. Med.*, Boston, **310**(24): 1581-4, 1984.
140. PARKS, J. & WORTH, H.G.J. Carboxyhemoglobin determination by second-derivative spectroscopy. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, **31**(2): 279-81, 1985.
141. PENNEY, D.G. Acute carbon monoxide poisoning: animal models. A review. *Toxicology*, Shannon, **62**:123-60, 1990.
142. PERRIGO, B.J. & JOYNT, B.P. Evaluation of current derivative spectrophotometric methodology for the determination of percent carboxyhemoglobin saturation in postmortem bloob samples, *J. Anal. Toxicol.*, Niles, **13**(1): 37-46, 1989.

143. PERUTZ, M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin , **Nature**, London, **228**:726-734, 1970.
144. PERUTZ, M.F. The hemoglobin molecule. In: CALVIN, M. & JOGGENSON, M.J. **Bio-organic chemistry**. S. Francisco, W.H. Freeman, 1968. p. 41-9.
145. PETERSEN, A.R.; SANDERSON, W.L.; LENHARI, S.W. Application of a pilot study to the development of an industrial hygiene sampling strategy. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, **47**(10): 655-8, 1986.
146. PETERSON, J.E. & STEWART, R.D., Absorption and elimination of carbon monoxide by inactive young men. **Arch. Environ. Health, Chicago**, **21**: 165-71, 1970.
147. PETERSON, J.E. Modeling the uptake, metabolism and excretion of dichloromethane by man. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, **39**: 41-7, 1978
148. PORTER, K. & VOLMAN, D.H. Flame ionization detection of carbon monoxide for gas chromatographic analysis. **Anal. Chem.**, Washington, **34**(7): 748-9, 1962.
149. PURSER, D.A. & BERRIL, K.R. Effects of carbon monoxide on behavior in monkeys in relation to human fire hazard. **Arch. Environ. Health, Chicago**, **38**(5): 308-15, 1983.
150. RAMIERI, A.J.; JATLOW, P; SELIGSON, D. New method for rapid determination of carboxyhemoglobin by use of double-wavelength spectrophotometry. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, **20**(2): 278-81, 1974.
151. RANNEY, H.M. Funções de transporte dos eritrócitos. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES, R.W., eds. **Hematologia**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p.118-23.
152. RAPPAPORT, S.M.; SELVIN, S.; SPEAR, R.C.; KEIL, C. Air sampling in the assessment of continuous exposures to acutely toxic chemicals. Part I. Strategy. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, **42**(11): 831-8, 1981.
153. REY, L. **Planejar e redigir trabalhos científicos**. São Paulo, Edgard Blucher, 1987. 240p.
154. RICHALET, J.P.; RUTGERS, V.; BOUCHET, P.; RIMER, J.C.; KEROMES, A.; DUVAL-ARNOULD, G.; RATHT, C. Diurnal variations of acute mountain sickness, colour vision, and plasma cortisol and ACTH at high altitude. **Aviat. Space Environ. Med.**, Washington, **60**:105-11, 1989.
155. ROACH, S.A. A more rational basis for air sampling programs. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, **27**(1): 1-12, 1966.
156. RODE, A.; ROSS, R. ; SHEPHARD, R.J., Smoking withdrawal programme: personality and cardiorespiratory fitness, **Arch. Environ. Health, Chicago**, **24**:27-36, 1972.
157. RODKEY, F.L. & COLLISON, H.A. An artifact in the analysis of oxygenated blood for its low carbon monoxide content. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, **16**(11): 896-9, 1970.

158. RODKEY, F.L.; HILL, T.A.; PITTS, L.L.; ROBERTSON, R.F. Spectrophotometric measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin in blood. *Clin Chem.*, Winston-Salem, **25**(8): 1388-93, 1979.
159. ROSEMBERG, J. *Tabagismo, sério problema de saúde pública*. São Paulo, ALMED, 1981. 370p.
160. ROSES, O.E. Monóxido de carbono. In: IOVINE, E. & SELVA, A., eds. - *El laboratorio en la clínica*. 3 ed., Buenos Aires, Panamericana, 1985. p.1312-23.
161. ROUGHTON, F.J.W. The intermediate compound hypothesis in relation to the equilibrium and kinetics of the reactions of haemoglobin with oxygen and carbon monoxide. In: ROUGHTON, F.J.W. & KENDREW J.K. eds., *Barcroft Memorial Conference Butterworths*, London, 1949. p.83. Apud: CASTELLINO, N. & SANNOLO, N. I legami dell'ossido di carbonio con le emoproteine intra ed extracellolari. Ruolo della Hb e meccanismi di tossicità del CO. *Arch. Sci. Lav.*, Roma, **3**: 29-58, 1987.
162. ROUGHTON, F.J.W. The equilibrium of carbon monoxide with human hemoglobin in whole blood, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York, **174**:177-88, 1970.
163. ROUGHTON, F.J.W. The equilibrium between carbon monoxide and sheep hemoglobin at very high percentage saturations., *J. Physiol.*, **126**:359-83, 1954.
164. ROUGHTON, F.J.W.; OTIS, A.B.; LYSTER, R.L.J. The determination of the individual equilibrium constants of the four intermediate reactions between oxygen and sheep hemoglobin. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **144**: 29, 1955. Appud: CASTELLINO, N. & SANNOLO, N. I legami dell'ossido di carbonio con le emoproteine intra ed extracellolari. Ruolo della Hb e meccanismi di tossicità del CO. *Arch. Sci. Lav.*, Roma, **3**: 29-58, 1987.
165. ROY, C.; BELLEMARE, G.R.; CHORNET, E. Effect of the sensitivity setting of a katharometer on response factors at low concentrations. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, **197**(2): 121-7, 1980.
166. RUSSEL, J.B. *Química geral*. São Paulo, MacGraw Hill, 1981. p. 721-38, 745-6.
167. RUSSEV, P.; GIUH, T.A.; WOOLAM, C.J. Detection of inorganic gases using a flame ionisation detector. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, **119**: 461-6, 1976.
168. SANDERSON, J.H.; SOTHERAN, M.F.; STATTERSFIELD, J.P. A new method of carboxyhemoglobin determination. *Br. J. Ind. Med.*, London, **35**(1): 67-72, 1978.
169. SANNOLO, N. Gas chromatographic quantitation of breath hydrogen and carbon monoxide for clinical investigation in adults and in children. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, **276**(2): 257-65, 1983.

170. SANNOLO, N.; BARILLARI, R.; SCOTTO, P.; CASTELLINO, N. Esposizione sperimentale all'ossido di carbonio: comportamento della viscosità, della p50, del 2,3- DPG e del lattato nel ratto. **Arch. Sci. Lav.**, Roma, 1: 211-5, 1985.
171. SCHAEFER, B.A. & DOUGLAS, D.M. The response of the flame ionisation detector to carbon monoxide and carbon dioxide. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, 9 (10): 612-9, 1971.
172. SCHAUM, D. **Física geral**, São Paulo, McGraw Hill, 1975. 430p.
173. SCHOENFISCH, W.H.; HOOP, K.A.; STRUELENS, B.S. Carbon monoxide absorption through the oral and nasal mucosae of cynomolgus monkeys. **Arch. Environ. Health**, Chicago, 35(3): 152-4, 1980.
174. SHARMA P. & PENNEY D.G. Effects of ethanol in acute carbon monoxide poisoning. **Toxicology**, Shannon, 62:213-26, 1990.
175. SIEGEL, S. - **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo, McGraw Hill, 1975. 350p.
176. SIPES, I.G. & GANDOLFI, A.J. - Biotransformation of toxicants. In: AMDUR, M.D.; DOULL, J.;KLAASSEN, C.D., eds. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poison**. 4ed. New York, Pergamon Press, 1991. p.90-96.
177. SMALL, K.A.; RADORD, E.P.; FRAZIER, J.M. et al. A rapid method for simultaneous measurement of carboxy- and methemoglobin in blood. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, 31:154-60, 1971
178. SMITH, J.R. & LANDAW, S.A. Smokers polycythemia. **N Engl. J. Med.**, Boston, 298(1): 6-10, 1978.
179. SMITH, R.P. - Toxic responses of the blood. In: AMDUR, M.D.; DOULL, J.;KLAASSEN, C.D., eds. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poison**. 4ed. New York, Pergamon Press, 1991. p.263-8.
180. STETTER, L.R.; RUTH, D.R.; BLURTON, K.F. Portable gas chromatography and electrochemical detector for carbon monoxide. **Anal. Chem.**, Washington, 48(6): 924-5, 1976.
181. STEWART, R.D. & FISHER, T.N. Carboxyhemoglobin elevation after exposure to dichloromethane. **Science**, Washington, 176(4032): 295-6, 1972.
182. STOKER, H.S. & SEAGER, S.L. **Environmental chemistry: air and water pollution.**, Glenview, Scott Foresman, 1972. p.8-24.
183. STRUMIA, M.M.; SAMPLE, A.B.; HART, E.D. An improved micro hematocrit method. **Am. J. Clin. Pathol.** Philadelphia, 24:1016-8, 1954.
184. STUPFEL, M. & BOULEY, G. Physiological and biochemical effects on rats and mice exposed to small concentrations of carbon monoxide for long periods. National Institute of Health and Research, Faris, 342-68.

185. STUPFEL, M.; VALLERON, A.J.; DEMEESTERE, M.; MASSÉ, H. Hypoxia survival variations in male and female mice as functions of chronological and environmental factors. *Aviat. Space Environ. Med.*, Washington, **49**(9): 1092-1092, 1978.
186. SUNDSTROM, G. Blood carboxyhemoglobin: results with conventional standards compared with those with a submicroliter reference of gaseous CO. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, **18**(3): 188-92, 1972.
187. TAKANO, T.; MIYAZAKI, UY.; SHIMOYAMA, H.; MAEDA, H.; OKEDA, R.; FUNATA, N. Direct effects of carbon monoxide on cardiac function. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, **49**(1): 35-40, 1981.
188. TAULIER, A.; LEVILLAIN, P.; LEMONNIER, A. Determining methemoglobin in blood by zero-crossing-point first-derivative spectrophotometry. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, **33**(10): 1767-70, 1987.
189. THE INTERNATIONAL TECHNICAL INFORMATION INSTITUTE - Toxic and hazardous industrial chemicals safety manual. Tokyo, 1976. p.107-8.
190. THE MERCK index 9ed. Rahway, 1976. p.231,1115..
191. THOM, S.R. & KEIM, L.W. Carbon monoxide poisoning: a review epidemiology, pathophysiology, clinical findings, and treatment options including hyperbaric oxygen therapy. *Clin. Toxicol.*, New York, **27**(3): 141-56, 1989.
192. TOUITOU, Y.; TOUITOU, C.; BOGDAN A.; REINBERG, ALIN.; AUZEBY, A.; BECK, H.; GUILLET, P. Differences between young and elderly subjects in seasonal and circadian variations of total plasma proteins and blood volume as reflected by hemoglobin, hematocrit, and erythrocyte counts. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, **32**(5): 801-4, 1986.
193. TRELA, B.A., CARLSON, G.P.; MAYER, P.R. Effect of carbon monoxide on the cytochrome P-450 mediated metabolism of aniline and p-nitroanisole in the isolated perfused rabbit lung., *J. Toxicol. Environ. Health*, Washington, **27**(3):331-40, 1989.
194. TRELA, B.A., CARLSON, G.P.; TUREK, J.; REBAR, A.; MATHEWS, J.M. Effect of carbon monoxide on the cytochrome P-450 mediated activation of 4-ipomeanol by the isolated perfused rabbit lung. , *J. Toxicol. Environ. Health*, Washington, **27**(3):341-350, 1989.
195. VAINIO, H. Is passive smoking increasing cancer risk ?. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, **13**(3): 193-6, 1987.
196. VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. *Fisiologia humana* , 3.ed. São Paulo, McGraw-Hill, 1981. p.378-423.
197. VERHOEFF, A.P.; van der VELDE, H.C.M.; BOLEIJ, J.S.M.; LEBRET, E.; BRUNEKREEFF, B. Detecting indoor CO exposure by measuring CO in exhaled breath. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, **53**(2): 167-73, 1983.
198. VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*, Rio de Janeiro, Campus, 1989. 294p.

199. VREMAN, H.J.; KWONG, L.K.; STEVENSON, D.K. Carbon monoxide in blood: An improved microliter blood-sample collection system, with rapid analysis by gas chromatography. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, 30(8): 1382-6, 1984.
200. VREMAN, H.J.; RONQUILLO, R.B.; ARIAGNO, R.L.; SCHWARTZ, H.C.; STEVENSON, D.K. Interference of fetal hemoglobin with the spectrophotometric measurement of carboxyhemoglobin. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, 34(5): 975-7, 1988.
201. VREMAN, H.J.; STEVENSON, D.K.; ZWART, A. Analisis for carboxyhemoglobin by gas chromatography and multicomponent spectrophotometry compared. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, 33(5): 694-7, 1987.
202. WAGNER, J.A.; HORVATH, S.M.; DAHMS, T.E., Carbon monoxide elimination. *Respir. Physiol.*, Amsterdam, 23:41-7. 1974.
203. WAKAMATSU, C.T.; MENDES, R. ; KITAMURA, S. O uso do laboratório em patologia profissional. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo, 3(10): 6-21, 1975.
204. WEISER, P.C.; MORRILL, C.G.; DICKEY, D.W.; KURT, T.L.; CROPP, G.J.A. Effects of low level carbon monoxide exposure on the adaptation of healthy young men to aerobic work at an altitude of 1,610 meters. In: FOLINSBEE, L.J., ed. *Environmental stress*, New York, Academic Press, 1978. p.101-11 [Proceedings of Symposiyum, University of California, 1977].
205. WHITE, P. Degradação da hemoglobina. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES, R.W., eds. *Hematologia*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p.156-61.
206. WHITE, P. Carbon monoxide production on heme catabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, New York, 174:23-31, 1970.
207. WIGFIELD, D.C.; HOLLEBONE, B.R.; McKEEN, J.E.; SELWIN, J.C. Assessment of the methods available for the determination of carbon monoxide in blood. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, 5(3): 122-5, 1981.
208. WILKS, S.S. Toxic photo-oxidation products in closed environments. *Aerosp Med.*, Washington, 34:838-41, 1963.
209. WILLIAMS, F.W.; WOODS, F.J.; UMSTEAD, M.E. Determination of carbon monoxide in the parts-per-million range with gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, Niles, 10(9): 570-2, 1972.
210. WILLIAMS, L.A. Carbon monoxide. Type A procedure. In: SUNSHINE, I., ed. *Methodology for analitycal toxicology*. Cleveland, CRC Press. 1975. p.64-6.
211. WILSON, H.K. Breath analysis; Physicological basis and sampling techniques. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 12: 174-92, 1986.
212. WOLFF, D.G. & BIDLACK, W.R. The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, 73:850-7, 1976.

213. ZIELHUIS, R.L. & HENDERSON, P.Th. Definitions of monitoring activities and their relevance for the practice of occupational health. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, **57**: 249-57, 1986.
214. ZWART, A.; BUURSMA, A.; OESEBURG, B.; ZIJLSTRA, W.G. Determination of hemoglobin derivatives with the il 282 CO-oximeter as compared with a manual spectrophotometric fixed-wavelength method. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, **27**(11): 1903-7, 1981.
215. ZWART, A.; van KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.G. Results of routine determination of clinically significant hemoglobin derivatives by multicomponent analysis. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, **32**(6): 972-8, 1986.

ANEXO I

EQUIVALÊNCIA ENTRE UNIDADES DE CONCENTRAÇÃO

Os fatores de conversão das unidades usadas na concentração de CO no ar são¹²⁷:

a 0 °C e 760 mmHg				
1	ppm	=	1,25 mg/m ³	
0,80	ppm	=	1 mg/m ³	
a 25 °C e 760 mmHg				
1	ppm	=	1,15 mg/m ³	
0,87	ppm	=	1 mg/m ³	
a 25 °C e 700 mmHg				
1	ppm	=	1,06 mg/m ³	
0,95	ppm	=	1 mg/m ³	

EQUIVALÊNCIA ENTRE UNIDADES DE PRESSÃO

pressão unidade (símbolo)	fator de multiplicação para conversão			
	Torr	milibar	Pa	mmHg
torricelli (Torr)	1	1,33	133,3	1
milibar (milibar)	0,75	1	100	0,75
pascal* (Pa)	0,0075	0,01	1	0,0075
milímetro de mercúrio (mmHg)	1	1,33	133,3	1

(*) Sistema Internacional de Unidades

Adaptado de SCHAUM¹⁷²

ANEXO II

RELAÇÕES MATEMÁTICAS ENTRE A CONCENTRAÇÃO ATMOSFÉRICA DE MONÓXIDO DE CARBONO E CARBOXIEMOGLOBINEMIA

Alguns autores têm proposto equações empíricas que permitem estimar as concentrações de carboxiemoglobina em diferentes condições de exposição. Essas diferem entre si quanto ao número e o tipo de variáveis, o que implica em resultados não necessariamente iguais para a mesma condição de exposição¹³⁷. Destacam-se:

1 - FORBES *et al.*(1945)⁶⁸ propuseram uma relação entre o aumento da concentração de carboxiemoglobina com a concentração de CO no ar e o tempo de exposição t:

$$\text{taxa de absorção de CO} = K \times P_{\text{CO}} \times \frac{[\text{COHb}_x] - [\text{COHb}_t]}{[\text{COHb}_x] - [\text{COHb}_0]}$$

onde **K** = constante proporcional à intensidade de atividade física, sendo igual a 3, 5, 8 e 11 para as condições de repouso, trabalho leve, moderado e pesado, respectivamente;

P_{CO} = pressão parcial de CO no ar inspirado;

[COHb] = concentração de carboxiemoglobina no início (0), no instante (t) e no momento de equilíbrio (x).

A partir desta, os autores formularam a equação simplificada para o cálculo do aumento da COHb. A variação na % de COHb numa determinada exposição, antes da situação de equilíbrio, pode ser calculada por:

$$[\Delta \text{COHb } \%] = K \times [\text{CO}] \times t$$

onde, **[CO]** = concentração de CO no ar ambiente (ppm);

t = tempo de exposição (min).

2 - LILIENTHAL & PINE (1946)¹¹⁴ popuseram uma equação análoga, incluindo um fator relativo à ventilação pulmonar:

$$\Delta \text{ COHb } \% = 0,05 \times V_E \times (P_{\text{CO}}) \times t$$

onde V_E = volume respiratório (L/min);

P_{CO} = pressão parcial de CO no ar inspirado (Torr);

t = tempo de exposição (min).

3 - PACE *et al.* (1946)¹³⁸ desenvolveram este tipo de equação adicionando um fator de volume sanguíneo(L); o aumento da % de COHb é obtido por:

$$\Delta \text{ COHb } \% = \frac{100 \times V_E \times [\text{CO}] \times t}{L}$$

onde, L = volume sanguíneo (L);

$[\text{CO}]$ = concentração de CO no ar inalado (%);

t = tempo de exposição (min).

4 - COBURN *et al.* (1965)³⁹ desenvolveram a fórmula mais sofisticada com a introdução das variáveis fisiológicas, relacionando a pressão de O_2 nos capilares pulmonares, a constante de afinidade relativa, a saturação de O_2 , a capacidade de difusão pulmonar, a ventilação alveolar, a produção endógena de CO e a pressão de CO no ar inspirado de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{d(\text{CO})}{dt} = V_{\text{CO}} - \frac{[\text{HbCO}]}{[\text{HbO}_2]} \times \frac{P_{\text{O}_2}}{M} \times \frac{1}{\frac{1}{D_L} + \frac{PB-47}{V_A}} + \frac{P_{\text{COi}}}{\frac{1}{D_L} + \frac{PB-47}{V_A}}$$

onde, $[\text{HbCO}]$ = concentração de CO no sangue (mL de CO/ mL de sangue;

$[\text{HbO}_2]$ = concentração de O_2 no sangue (mL de O_2 / mL de sangue;

D_L = capacidade de difusão pulmonar (mL/min/mmHg);

V_A = índice de ventilação alveolar;

PB = pressão barométrica;

P_{COi} = pressão parcial do CO inalado;

P_{O_2} = pressão média do oxigênio capilar pulmonar;

M = constante de Haldane(220-240 com pH=7,4);

V_{CO} = índice de produção endógena de CO (mL/min).

ANEXO III

LIMITES MÁXIMOS PERMISSÍVEIS DE MONÓXIDO DE CARBONO NO AR

[ppm (mg/m³)]

referência	LT	PEL	TLV		
			TWA	STEL	C
Legislação brasileira²⁶	39 ^a (43)	---	---	---	---
OSHA¹⁰⁴	---	50 (55)	---	---	---
NIOSH¹³²	---	---	35 ^b (39)	---	200 (220)
ACGIH⁵	---	---	50 ^c (55)	400 (440)	---

OSHA = OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION

NIOSH = NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH

ACGIH = AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS

TL = LIMITE DE TOLERÂNCIA

TLV = THRESHOLD LIMIT VALUE

TLV-TWA = TIME WEIGHTED AVERAGE

TLV-STEL = SHORT TERM EXPOSURE LIMIT

TLV-C = CEILING

TWA-PEL = PERMISSIBLE EXPOSURE LIMIT

a = exposição de 48 horas semanais

b = exposição de 40 horas semanais

c = estabelecido com base em efeitos no desempenho cardiovascular sob stress físico (1980)

Valores limites recomendados em outros países⁵:

Austrália, Finlândia, Holanda, Bélgica, Iugoslávia, Suíça e Alemanha Ocidental	50 ppm
Suécia	35 ppm
Alemanha Oriental	30 ppm
Tchecoslováquia, Hungria, România, Polónia	26 ppm
Bulgária, Rússia	17 ppm

ANEXO IV

LIMITES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO

referência	indicador biológico		
	COHb [sangue] (%)	CO [sangue] (mL/100mL)	CO [ar exalado] (ppm)
Legislação Brasileira²⁷			
limite	5 (NF)	---	---
valor referência	2 (NF) 6,5 (F)		
ACGIH⁵			
limite ^a	< 8	---	< 40
valor referência	0,4 a 0,7 (NF) 5 a 9 (F)		
Lauwerys¹¹²			
limite	5	10	18
valor referência	< 1 (NF)	< 0,15 (NF)	2 (NF)

ACGIH = American Conference of Governmental Industrial Hygienists

NF = não-fumante

F = fumante

a = colheita da amostra no final da jornada de trabalho