

# Padronização da coleta do condensado do exalado respiratório utilizando coletor específico para equinos

*Standardization of respiratory condensate collection using a specific collector for horses*

Thasla de Freitas Santi <sup>1\*</sup>  
Bianca Barbosa <sup>1</sup>  
Ana Carolina Rodak<sup>1</sup>  
Maria Luiza Vinholes Merhy Valente<sup>1</sup>  
Maria Fernanda Nogara <sup>1</sup>  
Julia Leal Strelow<sup>2</sup>  
Giulia Cristina Ribas Pelle<sup>1</sup>  
Bianca Faria Cuman<sup>1</sup>  
Saulo Henrique Weber <sup>1</sup>  
Pedro Vicente Michelotto Júnior <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup> Centro Estadual de Educação Profissional Erotides Ângelo Nichele, Curitiba, PR, Brasil

\*Correspondência: [tcosanti@gmail.com](mailto:tcosanti@gmail.com)

Recebido: 20 ago 2024 | Aceito: 20 dez 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.7213/acad.2025.23001>

Rev. Acad. Ciênc. Anim. 2025;23:e23001

## Resumo

A falta de padronização da técnica de coleta do condensado do exalado respiratório (CER) dificulta a comparação entre estudos devido às variações no resfriamento, temperaturas de coleta e falta de informações sobre a limpeza nasal e o equipamento. Este estudo avaliou o efeito da temperatura no interior do coletor quanto ao volume de amostra e à técnica de limpeza das narinas e sua influência sobre a contaminação das amostras, utilizando dois coletores de CER específicos para equinos desenvolvidos pelos autores. Foram utilizadas 15 éguas sem raça definida, testando-se dois meios de resfriamento – soluções 1 (gelo) e 2 (gelo com

sal) – e três formas de limpeza de narina – grupos AS (água e sabão), NaCl (soro fisiológico) e G (gaze seca) – para determinar a melhor técnica de coleta de CER. As amostras foram acondicionadas em meio Stuart e plaqueadas em ágar sangue e MacConkey. A temperatura média da coleta entre os meios não diferiu ( $p = 0,999$ ), assim como não houve correlação com o volume de amostras sem sal ( $p = 0,276$ ), com sal ( $p = 0,622$ ) e no novo coletor ( $p = 0,715$ ). A temperatura ambiente e o volume de amostras com gelo apresentaram correlação negativa moderada ( $p = 0,005$  e  $r = -0,680$ ), enquanto no novo coletor houve correlação negativa forte ( $p = 0,013$  e  $r = -0,860$ ). Quanto às bactérias, observou-se maior número de colônias Gram-positivas do que negativas em todos os grupos, sendo  $4,013 \pm 1,073$  vs.  $1,713 \pm 1,349$  bactérias ( $p = 0,001$ ) no grupo G;  $4,107 \pm 1,216$  vs.  $2,217 \pm 1,701$  bactérias ( $p = 0,006$ ) no grupo NaCl; e  $3,850 \pm 1,454$  vs.  $2,168 \pm 1,574$  bactérias ( $p = 0,019$ ) grupo AS. Não houve diferença na quantidade de bactérias entre os métodos de limpeza tanto para Gram-negativas ( $p = 0,920$ ) quanto para positivas ( $p = 0,990$ ). Conclui-se que, diante à ausência de diferenças entre os métodos de resfriamento, limpeza nasal e coletores, foram eleitos o resfriamento com gelo, limpeza com gaze seca e o novo coletor para utilização em estudos futuros.

**Palavras-chave:** Condensado do exalado respiratório. Equinos. Limpeza nasal. Resfriamento.

## Abstract

*The lack of standardization in exhaled breath condensate (EBC) collection techniques complicates the comparison of studies due to variations in cooling methods, collection temperatures, and inadequate reporting on nasal cleaning and equipment preparation. This study evaluated the effects of collection temperature on sample volume and the influence of nasal cleaning techniques on sample contamination, using two EBC collectors specifically developed for equines by the authors. Fifteen mixed-breed mares were used to test two cooling methods – solutions 1 (ice) and 2 (ice with salt) – and three nasal cleaning techniques – groups WS (water and soap), NaCl (physiological saline), and G (dry gauze). EBC samples were stored in Stuart transport medium and plated on blood agar and MacConkey agar for bacterial analysis. The average collection temperatures between cooling methods showed no significant differences ( $p = 0.999$ ). There was no correlation between collection temperature and sample volume for ice without salt ( $p = 0.276$ ), ice with salt ( $p = 0.622$ ), or the new collector ( $p = 0.715$ ). However, ambient temperature and sample volume showed a moderate negative correlation with ice cooling ( $p = 0.005$ ,  $r = -0.680$ ) and a strong negative correlation with the new collector ( $p = 0.013$ ,  $r = -0.860$ ). In terms of bacterial contamination, all groups exhibited higher numbers of Gram-positive colonies compared to Gram-negative colonies: group G had  $4.013 \pm 1.073$  vs.  $1.713 \pm 1.349$  bacteria ( $p = 0.001$ ); group NaCl had  $4.107 \pm 1.216$  vs.  $2.217 \pm 1.701$  bacteria ( $p = 0.006$ ); and group WS had  $3.850 \pm 1.454$  vs.  $2.168 \pm 1.574$  bacteria ( $p = 0.019$ ). There were no statistical differences between nasal cleaning methods for Gram-positive bacteria ( $p = 0.990$ ) or Gram-negative bacteria ( $p = 0.920$ ). In conclusion, given the lack of significant differences among cooling methods, nasal cleaning techniques, and collectors, the use of ice cooling, dry gauze cleaning, and the new collector is recommended for future studies.*

**Keywords:** Airways. Diagnosis. Equine. Exhaled breath condensate. Horses.

## Introdução

A coleta do condensado do exalado respiratório (CER) é um método não invasivo para a obtenção de amostras que representam o fluido de revestimento da superfície das vias aéreas (Kharitonov e Barnes,

2001; Dwyer, 2004), obtido a partir da condensação do ar exalado ao entrar em contato com a superfície fria do equipamento de coleta. O CER tem sido descrito para o acompanhamento de pacientes asmáticos por permitir a quantificação de diferentes biomarcadores, tais como peróxido de hidrogênio, pH, nitrito, leucotrieno B4, entre outros, os quais têm sido investigados para o diagnóstico de doenças respiratórias (Marlin et al., 2003; Hunt, 2007; Cathcart et al., 2013; Preez et al., 2017, 2019).

O método de coleta do CER tem sido relatado em diversas espécies como gatos (Kirschvink et al., 2005), bezerros (Reinhold et al., 2000), psitacídeos (Foldenauer et al., 2010) e equinos (Deaton et al., 2004; Duz et al., 2009; Whittaker et al., 2012) mostrando ser um método eficaz na investigação clínica das vias aéreas. Em equinos, existem diversas técnicas de coleta do CER, com diferentes equipamentos, em sua maioria com adaptações empregando máscaras comerciais usadas para inalação, como descrito por Santi et al. (2024).

As formas de coleta são diversas, assim como os meios de resfriamento utilizados e, consequentemente, as temperaturas de coleta. Marlin et al. (2003) utilizaram água e gelo, atingindo a temperatura de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Já Cathcart et al. (2013) e Whittaker et al. (2009) utilizaram gelo seco, atingindo a temperatura de aproximadamente  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, o que dificulta realizar comparações diretas entre os estudos.

Além da falta de padronização da técnica de coleta, não há informações sobre a limpeza nasal e do equipamento na coleta de CER e se esse fator influencia a contaminação das amostras. Há alguns estudos apenas relatando o microbioma de lavados traqueais ou broncoalveolares (Fernandes et al., 2011; Manguin et al., 2020).

Neste contexto, propondo um equipamento específico para equinos, diferentemente dos empregados em estudos anteriores, os autores entendem que a primeira etapa da pesquisa de validação do equipamento consiste na padronização da metodologia de coleta, iniciando pelo meio de congelamento e pela forma de limpeza das narinas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura no interior do coletor quanto ao volume de amostra obtido e avaliar a técnica de limpeza das narinas e sua influência sobre a contaminação das amostras, a partir do equipamento de coleta do CER específico para equinos desenvolvido pelos autores.

## Material e métodos

Com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o registro 02259, foram utilizadas 15 éguas mestiças, entre 4 e 20 anos de idade, do plantel didático da Clínica Veterinária Escola da Fazenda Experimental Gralha Azul (PUCPR), localizada no município de Fazenda Rio Grande, estado do Paraná. Testaram-se dois meios de resfriamento e três formas de limpeza de narina a fim de determinar qual a melhor técnica de coleta de CER por meio do equipamento desenvolvido. Além disso, realizou-se a mensuração da frequência respiratória (FR) das éguas por meio da contagem de movimentos tóraco-abdominais a cada coleta.

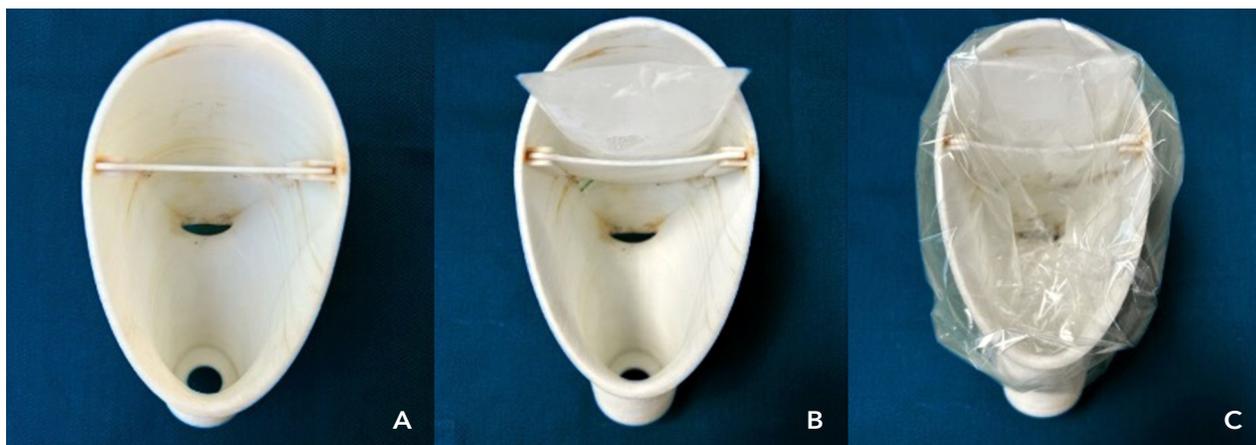
A coleta de CER foi realizada em cada égua, uma por vez, de forma randomizada a partir de sorteio, com o animal mantido em tronco de contenção. Nesse momento, um membro da equipe aproximava o coletor de CER em uma das narinas da égua, mantendo a coleta por 15 minutos na mesma narina ou alternando conforme o comportamento do animal.

## Equipamento de coleta do CER

O equipamento, impresso em ácido polilático por uma impressora 3D (CL2 Pro Plus - Cliever, Belo Horizonte, Brasil), é composto por dois compartimentos: câmara de resfriamento, com aproximadamente 4,5 cm altura e 7,5 cm de largura, e câmara de condensação, com aproximadamente 9 cm de altura e 8,5 cm de largura (Figura 1).

Em um dos compartimentos é acondicionado o gelo e no outro, a câmara de condensação (Figura 1A). Para a preparação do equipamento, é necessário incluir o método de resfriamento no compartimento superior (Figura 1B). Posteriormente, o equipamento é envolto por um saco plástico do tamanho A4 com a finalidade de isolar o material obtido de cada animal (Figura 1C), evitando contaminações.

Para a coleta do material, o equipamento era posicionado por 15 minutos em uma das narinas do animal. Ao final de cada coleta, o plástico que revestia o equipamento era removido para a retirada da amostra obtida, com o uso de uma pipeta. A amostra foi acondicionada em um microtubo congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise laboratorial.



**Figura 1** - Processo de montagem do equipamento de coleta do condensado do exalado respiratório de equinos, desenvolvido em parceria pelos cursos de medicina veterinária e desenho industrial da PUCPR. (A) Vista dorsal, evidenciando os dois compartimentos, sendo o superior a câmara de resfriamento e o inferior, a câmara de condensação. (B) Compartimento onde será colocado o gelo de água. (C) Envolvimento do equipamento por um saco plástico de folha A4.

### Meio de resfriamento

Para esta etapa, as amostras de CER foram obtidas utilizando o coletor portátil com dois meios de

resfriamento: na solução 1 foi acondicionado 90 ml de água dentro de um saco plástico com ziplock para formação do gelo em congelador convencional ( $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); na solução 2, acondicionou-se gelo de água

(90 ml) triturado, o qual foi posteriormente misturado a 80 g de sal refinado iodado do tipo comercial e armazenado dentro de saco plástico ziplock.

Ambas as soluções foram acondicionadas em sacos plásticos ziplock (8,5 cm x 6 cm) e mantidas em congelador convencional (-6 °C) até o momento da coleta. A coleta de CER foi empregada utilizando o equipamento e técnica descritos acima.

A temperatura do interior do equipamento foi mensurada minuto a minuto durante todo o tempo de coleta, utilizando um medidor de temperatura portátil (Incoterm, São Paulo, Brasil) fixado na parede interna do equipamento, a fim de obter temperaturas (em °C). Foram registradas a temperatura ambiente e umidade relativa do ar a partir de um termo-higrômetro (Incoterm, São Paulo, Brasil).

### Higienização das narinas

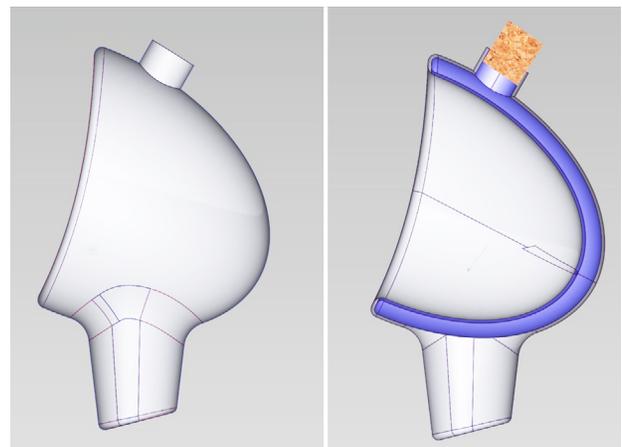
A limpeza das narinas foi realizada por meio de três soluções: água e sabão (grupo AS), solução fisiológica 0,9% (grupo NaCl) e gazes secas (grupo G). Cada égua passou por todos os métodos de limpeza, por meio de arranjo *crossover*, onde as coletas ocorreram em três dias distintos, com intervalo de dois dias entre eles. As éguas foram acompanhadas pelos sete dias seguintes ao procedimento para observação de qualquer sinal de irritação tecidual.

A limpeza nasal ocorreu pelo mesmo manipulador. Após vestir luvas de procedimento, iniciava-se o processo de higienização, realizado por três gazes contendo uma das soluções descritas, conforme rateio. Cada gaze foi friccionada desde a prega alar até todo o assoalho nasal, uma por vez, e ao final foram friccionadas mais duas gazes limpas secas para evitar contaminação das amostras com resíduos das soluções utilizadas.

Após cada coleta, as amostras foram acondicionadas através de um *swab* em meio de transporte Stuart - Transystem (Copan, Brescia, Itália) e, posteriormente, analisadas no Laboratório Paddocktiba, em Curitiba. As amostras foram plaqueadas em meio ágar sangue e ágar Macconkey e avaliadas de forma cega, com a contagem de colônias realizada em cada placa. A identificação das bactérias foi efetuada através de testes bioquímicos, por meio de catalase e oxidase, pertencentes ao Sistema Bactray (Laborclin, Paraná, Brasil). Em conjunto à identificação, realizou-se teste de Gram (Laborclin, Paraná, Brasil).

### Atualização do coletor de CER

Devido ao baixo volume das amostras obtidas com o coletor de CER (Figura 1), optou-se por desenvolver uma adaptação do dispositivo, ampliando a área de contato da câmara de resfriamento. A adaptação consiste em uma câmara oca que reveste todo o equipamento, permitindo a adição de água no interior do coletor (Figura 2). O protótipo foi confeccionado em material de filamento Pet G para impressão em 3D (CL2 Pro Plus - Cliever, Belo Horizonte, Brasil) e submetido a testes preliminares em estudo piloto.



**Figura 2** - Atualização da confecção do novo design do protótipo contendo uma câmara oca para colocação da água para congelamento (área em azul).

Nesta etapa subsequente, as mesmas 15 éguas foram utilizadas. Além disto, a temperatura interna do equipamento foi monitorada a cada minuto durante os 15 minutos de coleta, utilizando-se um medidor de temperatura portátil (Incoterm, São Paulo, Brasil) fixado na parede interna do equipamento, para obter os valores em graus Celsius. Adicionalmente, foram registradas a temperatura ambiente e umidade relativa do ar por meio de um termo-higrômetro (Incoterm, São Paulo, Brasil).

### Análises estatísticas

O teste de normalidade, para todos os dados, foi realizado através do teste D'Agostino Pearson. Os resultados das análises dos meios de resfriamentos

da coleta de CER, temperatura ambiente e umidade relativa do ar foram feitos a partir do teste T para amostras independentes. Para a análise da solução com menor contaminante, comparou-se o grau de contaminação das amostras de CER entre as três formas de limpeza nasal (grupos AS, NaCl e G) a partir do teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Todos os testes foram realizados através do programa IBM SPSS Statistics, versão 25.0 para Windows (IBM Corporation, New York, USA), considerando significativos valores de  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Meio de resfriamento

Não houve correlação entre a frequência respiratória e o volume de amostra obtido com relação ao antigo coletor ( $p = 0,686$ ), assim como no coletor novo ( $p = 0,280$ ). A temperatura média da coleta em cada meio e a cada momento não diferiu

( $p = 0,999$ ), assim como não houve correlação entre a temperatura de coleta e o volume de amostras sem sal ( $p = 0,276$ ) e com sal ( $p = 0,622$ ). Com relação ao coletor novo, também não houve correlação entre a temperatura de coleta e o volume de amostra ( $p = 0,715$ ).

A temperatura ambiente e o volume das amostras de gelo sem sal obtiveram uma correlação negativa moderada ( $p = 0,005$  e  $r = -0,680$ ), entretanto, no gelo com sal isto não ocorreu ( $p = 0,438$ ). No coletor novo, houve correlação negativa forte entre a temperatura ambiente e o volume de amostra ( $p = 0,013$  e  $r = -0,860$ ). A umidade relativa não apresentou qualquer correlação para as amostras de gelo sem sal ( $p = 0,445$ ) e com sal ( $p = 0,289$ ). Já para o novo coletor, a umidade relativa do ar e a temperatura de coleta obtiveram correlação positiva fraca ( $p = 0,003$  e  $r = 0,303$ ), dados apresentados na Tabela 1.

Em relação ao volume de amostra do coletor antigo e do coletor novo com gelo de água, não há diferença ( $p = 0,477$ ).

**Tabela 1** - Resultados obtidos a partir da coleta do condensado do exalado respiratório utilizando o método de resfriamento de gelo com adição de sal e gelo de água

|           | Coletor antigo             |                            | Coletor novo                 |
|-----------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
|           | Gelo com adição de sal     | Gelo de água               | Gelo de água                 |
| FR (mrpm) | 16,67 ± 5,94 (12 - 36)     | 18,27 ± 7,13 (12 - 32)     | 20,80 ± 5,90 (12 - 32)       |
| TC (°C)*  | 6,71 ± 5,61 (0,18 - 23,49) | 6,59 ± 4,75 (1,21 - 17,24) | 21,00 ± 3,14 (14,23 - 24,70) |
| TA (°C)   | 21,47 ± 1,41 (18 - 23)     | 21,40 ± 1,45 (18 - 24)     | 24,70 ± 3,50 (17 - 28)       |
| URA (%)   | 71,53 ± 8,61 (56 - 82)     | 70,47 ± 9,13 (56 - 82)     | 43,30 ± 13,30 (31 - 71)      |
| VA (µL)   | 330,00 ± 267,13 (0 - 1000) | 480,00 ± 518,51 (0 - 2000) | 383,30 ± 276,20 (50 - 1000)  |

Nota: FR (mrpm) = frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto); TC = temperatura da coleta; TA = temperatura ambiente; URA = umidade relativa do ar; VA = volume da amostra. Resultados apresentados em média ± desvio padrão (mínimo-máximo). \*Média das temperaturas registradas minuto a minuto da coleta de condensado do exalado respiratório, durante 15 minutos.

### Contaminação das amostras - Limpeza das narinas

Observou-se a presença de diversas bactérias, que foram identificadas e separadas em grupos, mostrando a frequência que elas aparecem em cada um dos grupos de antissepsia. Ainda, notou-se que as mesmas bactérias aparecem independentemente da forma de higienização nasal (Tabela 2), com um maior número de colônias Gram-positivas

do que Gram-negativas entre todos os grupos, sendo:  $4,013 \pm 1,073$  vs.  $1,713 \pm 1,349$  bactérias ( $p = 0,001$ ) no grupo G;  $4,107 \pm 1,216$  vs.  $2,217 \pm 1,701$  bactérias ( $p = 0,006$ ) no grupo NaCl; e  $3,850 \pm 1,454$  vs.  $2,168 \pm 1,574$  bactérias ( $p = 0,019$ ) no grupo AS (Tabela 3). Não houve diferença estatística entre os métodos de limpeza nasal utilizados neste projeto se comparada a quantidade de bactérias Gram-negativas ( $p = 0,920$ ) e Gram-positivas ( $p = 0,990$ ) entre os grupos.

**Tabela 2** - Identificação das bactérias através de cultura bacteriana, por meio da contagem de colônias, pertencentes aos grupos gaze seca (G), soro fisiológico (NaCl) e água e sabão (AS)

| Bactéria                          | Quantidade por grupo |      |    |
|-----------------------------------|----------------------|------|----|
|                                   | G                    | NaCl | AS |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>    | 5                    | 6    | 6  |
| <i>Escherichia coli</i>           | 11                   | 10   | 10 |
| <i>Klebsiella ornithinolytica</i> | 8                    | 8    | 7  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 12                   | 12   | 13 |
| <i>Micrococcus spp</i>            | 4                    | 6    | 5  |
| <i>Proteus mirabilis</i>          | 1                    | 1    | 1  |
| <i>Proteus vulgaris</i>           | 5                    | 5    | 5  |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 2                    | 2    | 2  |
| <i>Staphylococcus NPC</i>         | 5                    | 6    | 6  |
| <i>Streptococcus B hemolítico</i> | 12                   | 10   | 12 |

**Tabela 3** - Quantidade de colônias Gram-positivas e Gram-negativas encontradas nos grupos gaze seca (G), soro fisiológico a 0,9% (NaCl) e água e sabão (AS)

| Colônias       | Grupos                               |                                     |                                   |
|----------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|                | G                                    | NaCl                                | AS                                |
| Gram-positivas | 4.013,33 ± 1.072,95<br>(5000 - 1800) | 4.106,66 ± 1.216,23<br>(5000 - 800) | 3.850 ± 1.453,69<br>(5000 - 350)  |
| Gram-negativas | 1.712,66 ± 1.349,08<br>(4000 - 30)   | 2.216,66 ± 1.701,27<br>(5000 - 10)  | 2.094,64 ± 1.605,97<br>(4000 - 5) |

Nota: resultados apresentados em média ± desvio padrão (mínimo-máximo).

## Discussão

Este estudo traz comparações entre métodos de padronização da obtenção de amostras do CER, como a forma de resfriamento e limpeza das narinas, com o intuito de facilitar a coleta e assim possibilitar futuramente um estudo comparativo entre autores.

Em relação à forma de higienização das narinas, observa-se que não houve diferença entre os métodos aplicados, provavelmente porque a limpeza das narinas não deve influenciar a população de bactérias do CER. Como é proveniente de diferentes níveis da árvore respiratória, a amostra de CER deve ter a presença de bactérias de vias aéreas superiores bem como inferiores. Assim, na técnica de coleta de CER com o coletor portátil para equinos, definiu-se a limpeza das narinas com gazes secas no sentido de diminuir a quantidade de

sujidades. As bactérias encontradas na população de cavalos saudáveis investigada foram as Gram-positivas *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus NPC*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus B hemolítico*, e as Gram-negativas *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella ornithionolytica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *P. vulgaris*, sendo 66% das bactérias Gram-positivas e 34% Gram-negativas.

Algumas das bactérias encontradas no CER de equinos assintomáticos no presente trabalho também foram evidenciadas em lavados traqueobrônquicos de equinos saudáveis (Fernandes et al., 2011), e em aspirados traqueais de pôneis idosos e saudáveis (Darien et al., 1990) foram encontradas bactérias do tipo *Staphylococcus sp.*, entre as mais comuns, além de *Acinetobacter sp.*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis* e *Streptococcus equi*.

O *Streptococcus B* hemolítico foi uma das bactérias mais abundantes encontradas pelos autores nas coletas de CER de animais a pasto. Estas são facilmente isoladas de mucosas do trato respiratório e da superfície corpórea de equinos, por isso parte das infecções são oportunistas (Quinn et al., 2019). Entretanto, possuem potencial patogênico para a área pulmonar (Racklyeft e Love, 2000). Em equinos, *Streptococcus B*-hemolíticos são frequentemente associados a casos de broncopneumonia, e doenças respiratórias inflamatórias (Couëtil et al., 2016) foram encontradas em estudo retrospectivo de lavagens traqueais em cavalos jovens (Wood et al., 1993) com e sem sinais clínicos (Christley et al., 2001; Santos et al., 2007). Além disto, o *Streptococcus* também esteve prevalente em amostras obtidas de aspirados traqueais de cavalos com asma (Manguin et al., 2020), bem como em amostras de biopsias bronquiais em pessoas apresentando asma mediada por IgE (Millares et al., 2017). Apesar da variação de idade entre 5 e 20 anos para os animais investigados, não houve diferença entre a população bacteriana. Todos os animais eram assintomáticos, entretanto esta bactéria se mostrou presente em todas as amostras.

Com relação à presença de *E. coli*, esta também foi encontrada na nasofaringe (Fernandes et al., 2011) e nas vias aéreas inferiores (Winther et al., 2011) de equinos saudáveis. Este patógeno é comumente associado ao intestino de animais, de forma comensal, entretanto algumas cepas podem ser patogênicas devido a diferentes mecanismos de virulência e podem causar diversas doenças (Piazza et al., 2021), além da contaminação ambiental, fato este que pode ser associado às éguas do estudo viverem a campo e em conjunto, o que facilita a propagação e a maior quantidade de *E. coli* devido a uma possível contaminação ambiental.

No presente estudo, encontrou-se a presença de *K. pneumoniae*, as quais foram citadas no estudo de Fernandes et al. (2011) e de Winther et al. (2011) em infecções virais e bacterianas do trato respiratório anterior, em pneumonias e em broncopneumonia bacteriana, o que difere do presente estudo, onde não havia nenhum animal com alteração em vias aéreas, nem nenhum sinal clínico compatível com as doenças citadas. Nos estudos de Fillion-Bertrand et al. (2019) e Newton et al. (2003), as bactérias do tipo *Acinetobacter* também estiveram

presentes entre as cinco mais abundantes, assim como no presente estudo, porém bactérias nasais/orais foram mais abundantes do que as encontradas nos broncoalveolares. Conclui-se, assim, que os microbiomas orais e nasais são influenciados pelo ambiente, porém não têm influência pelo estado da doença; ou seja, animais asmáticos não possuem maior predisposição, o que corrobora o presente estudo, uma vez que a coleta de CER envolve as superfícies nasais/orais (lábio superior), além da amostra proveniente da região pulmonar, podendo ser esta uma justificativa para a quantidade de bactérias encontradas no CER de animais assintomáticos.

Ao avaliar os resultados obtidos, notou-se que todas as bactérias aparecem independentemente da forma de higienização nasal, sugerindo que as bactérias são provenientes de outras porções do sistema respiratório dos cavalos, não somente das narinas e assoalho nasal, mas provavelmente de outras regiões, inclusive pulmonar e/ou ambientais. Como cita o estudo de Fillion-Bertrand et al. (2019), o microbioma pulmonar é influenciado pelo ambiente, demonstrando concordância com o estudo de McMullen et al. (2020) sobre gados, que afirma que a população bacteriana varia de acordo com as diferentes regiões da árvore respiratória.

No presente estudo, a temperatura da coleta não influenciou no volume de amostra; contudo, não foi possível diferenciar a temperatura da coleta e a temperatura do ar exalado dentro do coletor, o que pode ter influenciado os resultados, sendo uma limitação a ser ajustada em etapas futuras (corrigir o posicionamento do termômetro, o qual estava localizado no centro do equipamento). Entretanto, com relação à temperatura ambiente, volume de amostras de gelo de água (sem sal) e coletor novo, em ambas as amostras com apenas gelo de água houve uma correlação negativa moderada a forte, ou seja, quanto maior a temperatura ambiente, menor o volume de amostra. Além disto, na avaliação do novo coletor, houve uma correlação positiva entre a umidade relativa do ar e a temperatura de coleta, ou seja, a umidade relativa do ar interferiu na temperatura de coleta. Para etapas futuras, recomenda-se realizar as coletas durante os períodos mais frescos do dia e em locais com temperatura mais amena para minimizar a influência da temperatura ambiente e umidade relativa do ar.

Desta forma, optou-se por padronizar o uso de gelo de água, devido a sua praticidade. Além disto, a temperatura com gelo e sal atingia inicialmente uma temperatura mais baixa, entretanto, esta não se mantinha ao longo do tempo de coleta (Anexo). Sendo assim, elegeu-se o novo coletor com gelo de água para futuros testes.

Entretanto, mais estudos com a microbiologia do CER precisam ser realizados, a fim de definir com maior clareza as bactérias provenientes do sistema respiratório e verificar se esta variação pode ser atribuída a diferenças bioquímicas e fisiológicas, incluindo pH, concentração de CO<sub>2</sub>, temperatura, tipo de células epiteliais e espessura da mucosa (Dickson et al., 2015; Man et al., 2017; Chase et al., 2019), e se há influência ambiental nessa população bacteriana.

## Conclusão

Como não houve diferença estatística entre os métodos de higienização nasal e resfriamento, elegeu-se o gelo de água e a gaze seca como as melhores opções neste estudo. Além disto, como não houve diferença estatística entre os volumes de amostras entre os coletores antigo e novo, elegeu-se o novo modelo para etapas futuras devido à praticidade do novo equipamento. Foi possível identificar colônias bacterianas através da amostra de CER obtida, o que será importante em estudos futuros para melhor entendimento da microbiologia do sistema respiratório de equinos, investigando suas mudanças em relação a diferentes condições clínicas e influência das doenças na análise dos resultados dos biomarcadores de CER.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Código 001. Os autores agradecem o Laboratório Paddocktilba pelas análises efetuadas.

## Referências

Cathcart MP, Love S, Sutton DGM, Reardon RJM, Hughes KJ. The application of exhaled breath analysis in racing Thorough-

breeds and the influence of high intensity exercise and ambient temperature on the concentration of carbon monoxide and pH in exhaled breath. *Vet J.* 2013;197(2):318-23.

Chase C, Kaushik RS. Mucosal immune system of cattle: all immune responses begin here. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2019;35(3):431-51.

Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Wood JL, Reids SW, Whitear KG, et al. A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J.* 2001;33(3):256-64.

Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R, Richard EA. Inflammatory airway disease of horses – Revised consensus statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):503-15.

Darien BJ, Brown CM, Walker RD, Williams MA, Derksen FJ. A tracheoscopic technique for obtaining uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture in the horse. *Equine Vet J.* 1990;22(3):170-3.

Deaton MC, Marlin DJ, Smith NC, Smith KC, Newton RJ, Gower SM, et al. Breath condensate hydrogen peroxide correlates with both airway cytology and epithelial lining fluid ascorbic acid concentration in the horse. *Free Radic Res.* 2004;38(2):201-8.

Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted Island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(6):821-30.

Duz M, Whittaker AG, Love S, Parkin TDH, Hughes KJ. Exhaled breath condensate hydrogen peroxide and pH for the assessment of lower airway inflammation in the horse. *Res Vet Sci.* 2009;87(2):307-12.

Dwyer TM. Sampling airway surface liquid: non-volatiles in the exhaled breath condensate. *Lung.* 2004;182(4):241-50.

Fernandes WR, Sanchez A, Ramos MCC, Souza VRC, Coelho CS. Achados microbiológicos do lavado traqueobrônquico de equinos clinicamente sadios e daqueles portadores de afecções do sistema respiratório. *Ars Vet.* 2011;27(2):73-9.

Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, Lavoie JP, Huffnagle GB, Leclere M. Lung microbiome is influenced by the environment and asthmatic status in an equine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;60(2):189-97.

- Foldenauer U, Simova-Curd S, Nitzil D, Bogdanova A, Zollinger E, Hatt JM. Analysis of exhaled breath condensate in a mixed population of psittacine birds. *J Avian Med Surg.* 2010;24(3):185-91.
- Hunt J. Exhaled breath condensate: an overview. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27(4):587-96.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(7):1693-722.
- Kirschvink N, Marlin D, Delvaux F, Leemans J, Clercx C, Sparkes A, et al. Collection of exhaled breath condensate and analysis of hydrogen peroxide as a potential marker of lower airway inflammation in cats. *Vet J.* 2005;169(3):385-96.
- Man WH, Piters WAAS, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):259-70.
- Manguin E, Pépin E, Boivin R, Leclere M. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J Vet Intern Med.* 2020;34(2):986-95.
- Marlin DJ, Deaton CM, Newton CM, Smith KC. Breath condensate measures of airway inflammation. In: Workshop on 'Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome'. Havemeyer Foundation Monograph Series. 2003;9:62-5.
- McMullen C, Alexander TW, Léguillette R, Workentine M, Timsit R. Topography of the respiratory tract bacterial microbiota in cattle. *Microbiome.* 2020;8(1):91.
- Millares L, Bermudo G, Pérez-Brocal V, Domingo C, Garcia-Nuñez M, Pomares X, et al. The respiratory microbiome in bronchial mucosa and secretions from severe IgE-mediated asthma patients. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):20.
- Newton JR, Wood JLN, Chanter N. A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK Thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med.* 2003;60(1):107-32.
- Piazza RMF, Taddei CR, Franzolin MR, Bueris V, Elias WP. Infecções intestinais causadas por *Escherichia coli*. In: Focaccia R, Siciliano RF, editors. *Tratado de infectologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2021. p. 1365-72.
- Preez S, Raidal SL, Doran GS, Nielsen SG, Hughes KJ. The consistency and influence of environmental and animal factors on exhaled breath condensate hydrogen peroxide, pH and leukotriene B4 in horses. *Vet J.* 2017;226:46-50.
- Preez S, Raidal SL, Doran GS, Prescott M, Hughes KJ. Exhaled breath condensate hydrogen peroxide, pH and leukotriene B4 are associated with lower airway inflammation and airway cytology in the horse. *Equine Vet J.* 2019;51(1):24-32.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S. *Microbiologia Veterinária: Essencial*. Porto Alegre: Artmed; 2018.
- Racklyeft DJ, Love DN. Bacterial infection of the lower respiratory tract in 34 horses. *Aust Vet J.* 2000;78(8):549-59.
- Reinhold P, Jaeger J, Schroeder C. Evaluation of methodological and biological influences on the collection and composition of exhaled breath condensate. *Biomarkers.* 2006;11(2):118-42.
- Santi TF, Barbosa B, Weber SH, Michelotto PV. Exhaled breath condensate analysis in horses: A scoping review. *Res Vet Sci.* 2024;168:105160.
- Santos LCP, Michelotto Jr PV, Kozemjak DA. Achados endoscópico e citológico das vias respiratórias de potros puro sangue inglês em início de treinamento no Jockey Clube do Paraná. *Arq Cien Vet Zool Unipar.* 2007;10(1):9-13.
- Whittaker AG, Love S, Parkin TDH, Duz M, Hughes KJ. Stabling causes a significant increase in the pH of the equine airway. *Equine Vet J.* 2009;41(9):940-3.
- Whittaker AG, Love S, Parkin TDH, Duz M, Cathcart M, Hughes KJ. Assessment of the impact of collection temperature and sampler design on the measurement of exhaled breath condensate pH in healthy horses. *Vet J.* 2012;191(2):208-12.
- Winther L, Guardabassi L, Baptiste KE, Friis C. Antimicrobial disposition in pulmonary epithelial lining fluid of horses. Part I. Sulfadiazine and trimethoprim. *J Vet Pharmacol Ther.* 2011;34(3):277-84.
- Wood JL, Burrell MH, Roberts CA, Chanter N, Shaw Y. *Streptococci* and *Pasteurella* spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. *Equine Vet J.* 1993;25(4):314-8.

## Anexo

**Tabela 1** - Gelo de água - Coletor antigo

| A  | Tempo de coleta (minutos) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | V   | T    |
|----|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|
|    | 1                         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   |     |      |
| 1  | 5,3                       | 3,4  | 2,5  | 3,1  | 3,5  | 2,5  | 3,3  | 2,1  | 2,5  | 3,0  | 3,1  | 1,7  | 1,7  | 2,1  | 2,0  | 0,9 | 2,8  |
| 2  | 6,2                       | 6,5  | 6,7  | 6,7  | 5,4  | 5,4  | 5,2  | 4,7  | 5,0  | 4,5  | 3,9  | 4,9  | 5,3  | 3,6  | 3,6  | 0,4 | 5,2  |
| 3  | 4,6                       | 4,6  | 4,3  | 4,7  | 3,7  | 3,9  | 4,0  | 4,1  | 4,8  | 4,7  | 4,4  | 4,3  | 4,5  | 4,5  | 4,3  | 0,8 | 4,4  |
| 4  | 5,5                       | 5,9  | 6,8  | 8,8  | 8,3  | 7,3  | 7,0  | 7,1  | 7,5  | 7,5  | 8,5  | 8,9  | 8,8  | 8,9  | 9,6  | 0,2 | 7,8  |
| 5  | 2,3                       | 1,9  | 2,7  | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,9  | 5,1  | 3,3  | 3,4  | 3,4  | 3,6  | 3,2  | 4,4  | 0,8 | 3,1  |
| 6  | 4,5                       | 5,6  | 6,1  | 6,2  | 7,5  | 8,5  | 8,8  | 9,6  | 10,8 | 11,6 | 11,5 | 11,9 | 11,6 | 11,1 | 9,8  | 0,2 | 9,0  |
| 7  | 11,6                      | 8,7  | 8,5  | 8,8  | 8,8  | 8,9  | 8,9  | 8,8  | 8,8  | 8,8  | 8,8  | 8,6  | 8,6  | 8,8  | 8,6  | 0,2 | 8,9  |
| 8  | 8,5                       | 11,0 | 12,1 | 11,8 | 11,9 | 13,1 | 14,4 | 15,9 | 16,1 | 16,1 | 16,2 | 16,3 | 1,1  | 16,5 | 16,3 | 0,0 | 14,1 |
| 9  | 1,1                       | 1,5  | 1,6  | 1,4  | 1,0  | 1,0  | 1,1  | 1,0  | 1,5  | 1,3  | 1,0  | 0,9  | 1,2  | 1,3  | 1,3  | 0,1 | 1,2  |
| 10 | 14,0                      | 16,5 | 15,7 | 15,5 | 17,1 | 16,8 | 15,5 | 15,9 | 17,0 | 18,3 | 20,9 | 20,5 | 18,5 | 18,5 | 18,5 | 2,0 | 17,2 |
| 11 | 1,8                       | 1,7  | 1,6  | 1,9  | 1,8  | 2,9  | 3,1  | 3,9  | 5,4  | 8,3  | 8,5  | 8,1  | 9,5  | 10,3 | 9,0  | 0,1 | 5,2  |
| 12 | 2,3                       | 1,3  | 1,9  | 2,7  | 2,6  | 2,9  | 2,9  | 3,2  | 3,2  | 2,8  | 2,7  | 0,8  | 2,3  | 2,2  | 2,0  | 0,1 | 2,4  |
| 13 | 4,8                       | 2,8  | 2,0  | 2,4  | 2,8  | 2,6  | 2,6  | 2,6  | 3,0  | 3,0  | 3,4  | 3,4  | 3,2  | 3,4  | 3,2  | 0,8 | 3,0  |
| 14 | 10,5                      | 11,1 | 11,0 | 11,0 | 11,5 | 12,2 | 13,5 | 13,6 | 12,5 | 12,1 | 11,8 | 11,3 | 10,6 | 10,3 | 10,5 | 0,3 | 11,6 |
| 15 | 3,7                       | 2,9  | 2,9  | 2,9  | 3,8  | 4,0  | 3,6  | 2,5  | 2,7  | 2,5  | 2,7  | 2,9  | 2,1  | 2,2  | 3,6  | 0,3 | 3,0  |
| M  | -                         | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0,5 | 5,2  |

Nota: A = animal; V = volume (ml); T = temperatura média; M = média.

**Tabela 2** - Gelo com sal - Coletor antigo

| A  | Tempo de coleta (minutos) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | V   | T    |
|----|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|
|    | 1                         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   |     |      |
| 1  | 2,7                       | 5,1  | 7,2  | 8,4  | 9,9  | 10,6 | 11,0 | 10,9 | 11,0 | 11,3 | 11,6 | 12,8 | 14,3 | 14,4 | 14,8 | 0,4 | 10,4 |
| 2  | 0,6                       | 7,1  | 8,2  | 5,6  | 5,8  | 7,6  | 8,9  | 6,6  | 6,5  | 5,6  | 5,8  | 6,5  | 8,7  | 11,0 | 12,9 | 0,1 | 7,2  |
| 3  | 0,1                       | -0,1 | -1,5 | -2,2 | -0,4 | 0,6  | -2,0 | -0,4 | -0,4 | -0,4 | 1,8  | 2,0  | 1,6  | 2,0  | 2,0  | 0,0 | 0,2  |
| 4  | 12,7                      | 13,2 | 10,8 | 11,9 | 11,5 | 11,0 | 10,5 | 10,0 | 9,9  | 10,0 | 10,3 | 9,6  | 9,4  | 9,1  | 9,1  | 0,5 | 10,6 |
| 5  | -3,4                      | 4,1  | 5,3  | 5,6  | 4,2  | 4,0  | 4,4  | 7,1  | 7,4  | 8,2  | 8,1  | 6,1  | 6,1  | 3,3  | 8,4  | 0,2 | 5,3  |
| 6  | 1,3                       | 2,3  | 3,8  | 4,9  | 4,8  | 5,0  | 5,6  | 5,8  | 6,4  | 6,9  | 6,9  | 6,7  | 7,1  | 7,9  | 8,4  | 0,5 | 5,6  |
| 7  | -0,8                      | 0,4  | -1,5 | 1,6  | 38,0 | 0,4  | 5,4  | -1,4 | -3,6 | -0,6 | 4,0  | 0,1  | -0,1 | 3,0  | 6,0  | 0,0 | 1,1  |
| 8  | 3,9                       | 4,1  | 4,2  | 4,2  | 4,2  | 5,4  | 6,6  | 6,1  | 6,3  | 6,0  | 6,5  | 5,8  | 5,3  | 5,3  | 5,2  | 0,2 | 5,3  |
| 9  | 19,3                      | 20,1 | 20,2 | 21,2 | 23,5 | 25,0 | 24,6 | 24,8 | 24,1 | 25,6 | 24,5 | 24,3 | 25,3 | 25,0 | 24,9 | 0,3 | 23,5 |
| 10 | 12,1                      | 9,6  | 6,4  | 4,4  | 8,2  | 4,5  | 7,2  | 4,3  | 4,0  | 0,3  | 0,6  | 2,4  | 5,5  | 6,7  | 7,2  | 1,0 | 5,5  |
| 11 | 7,6                       | 8,2  | 8,6  | 9,2  | 9,6  | 9,5  | 9,1  | 9,5  | 9,6  | 10,7 | 12,9 | 13,0 | 13,6 | 14,1 | 14,1 | 0,3 | 10,6 |
| 12 | 3,5                       | 1,1  | 3,1  | 4,6  | 7,1  | 7,0  | 6,7  | 4,4  | 6,2  | 1,1  | 1,4  | 5,5  | 7,9  | 6,5  | 6,6  | 0,3 | 4,8  |
| 13 | -1,5                      | 3,7  | 7,3  | 10,8 | 8,5  | 8,2  | 10,6 | 1,8  | 3,3  | 2,7  | 2,3  | 1,6  | -2,3 | 0,6  | -3,3 | 0,5 | 3,6  |
| 14 | 1,2                       | 0,5  | 0,5  | 1,2  | 0,2  | 0,4  | 1,3  | 2,0  | 3,5  | 5,0  | 5,1  | 5,9  | 5,9  | 6,8  | 7,6  | 0,6 | 3,1  |
| 15 | 1,0                       | 4,2  | 6,0  | 8,1  | 6,9  | 3,3  | 1,4  | 5,3  | 8,1  | 9,0  | 6,3  | 2,8  | -3,6 | -1,7 | 2,0  | 0,0 | 3,9  |
| M  | -                         | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0,4 | 6,7  |

Nota: A = animal; V = volume (ml); T = temperatura média; M = média.

**Tabela 3** - Gelo de água - Coletor novo

| A  | Tempo de coleta (minutos) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | V   | T    |
|----|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|
|    | 1                         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   |     |      |
| 1  | 16,9                      | 16,6 | 16,5 | 16,8 | 17,6 | 18,6 | 19,3 | 20,3 | 21,1 | 21,6 | 22,0 | 22,3 | 23,3 | 23,5 | 23,3 | 0,5 | 19,9 |
| 2  | 9,5                       | 10,9 | 12,5 | 14,3 | 15,9 | 16,3 | 16,8 | 17,3 | 18,9 | 19,6 | 19,1 | 19,8 | 21,0 | 20,9 | 21,8 | 0,5 | 16,9 |
| 3  | 25,5                      | 27,1 | 27,0 | 27,3 | 28,3 | 28,6 | 28,8 | 28,9 | 29,7 | 29,8 | 29,9 | 29,9 | 30,1 | 30,1 | 29,9 | 0,5 | 28,7 |
| 4  | 15,8                      | 20,9 | 23,5 | 25,4 | 26,5 | 27,1 | 27,5 | 27,5 | 27,8 | 28,4 | 28,3 | 28,6 | 28,5 | 28,8 | 28,8 | 0,4 | 26,2 |
| 5  | 19,9                      | 20,7 | 20,9 | 20,8 | 21,7 | 22,3 | 22,8 | 23,8 | 25,0 | 25,7 | 25,9 | 26,1 | 26,5 | 27,1 | 27,2 | 0,3 | 23,7 |
| 6  | 17,8                      | 24,3 | 26,4 | 27,5 | 28,7 | 29,4 | 29,5 | 29,9 | 30,2 | 30,6 | 30,6 | 31,3 | 31,2 | 31,3 | 31,5 | 0,1 | 28,6 |
| 7  | 10,0                      | 11,1 | 12,2 | 14,1 | 15,9 | 17,8 | 18,7 | 20,0 | 20,9 | 21,9 | 22,8 | 23,5 | 24,1 | 24,6 | 25,1 | 0,4 | 18,8 |
| 8  | 6,8                       | 8,5  | 9,8  | 11,9 | 12,9 | 4,5  | 15,6 | 17,3 | 18,4 | 19,9 | 21,6 | 22,6 | 23,3 | 23,8 | 24,1 | 0,2 | 16,7 |
| 9  | 13,6                      | 13,9 | 4,1  | 15,5 | 17,0 | 18,1 | 18,8 | 19,7 | 20,7 | 21,5 | 22,1 | 22,7 | 23,3 | 23,8 | 24,0 | 0,5 | 19,2 |
| 10 | 12,8                      | 15,0 | 18,0 | 19,9 | 20,7 | 21,8 | 22,5 | 22,5 | 23,6 | 24,3 | 24,5 | 25,2 | 25,8 | 26,0 | 27,1 | 0,6 | 21,9 |
| 11 | 19,0                      | 23,5 | 24,2 | 25,0 | 26,6 | 27,3 | 28,5 | 28,4 | 29,2 | 28,8 | 29,2 | 30,0 | 30,5 | 30,2 | 30,7 | 0,1 | 27,3 |
| 12 | 1,0                       | 1,9  | 2,8  | 4,0  | 4,1  | 4,5  | 4,6  | 4,1  | 4,9  | 6,1  | 5,5  | 6,3  | 6,3  | 5,6  | 5,3  | 0,8 | 4,4  |
| 13 | 12,7                      | 5,7  | 17,7 | 16,7 | 17,2 | 18,1 | 18,3 | 17,5 | 18,0 | 18,3 | 18,2 | 17,5 | 16,3 | 16,6 | 18,4 | 1,0 | 17,1 |
| 14 | 18,3                      | 21,3 | 3,4  | 24,1 | 25,0 | 25,5 | 26,8 | 27,7 | 27,8 | 27,9 | 28,6 | 9,1  | 29,3 | 29,5 | 29,8 | 0,2 | 26,2 |
| 15 | 13,9                      | 14,1 | 14,2 | 15,0 | 15,9 | 16,8 | 17,6 | 18,0 | 18,0 | 19,9 | 20,1 | 20,8 | 20,9 | 21,2 | 23,5 | 0,1 | 17,9 |
| M  | -                         | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0,4 | 20,9 |

Nota: A = animal; V = volume (ml); T = temperatura média; M = média.