

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

CRISTIANE RIBEIRO DE ANDRADE JUNQUEIRA

**Monitoramento da interação de substâncias mucoativas em muco
brônquico humano de portadores de fibrose cística por meio da
técnica fotoacústica**

São José dos Campos – SP
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cristiane Ribeiro de Andrade Junqueira

**Monitoramento da interação de substâncias mucoativas em muco
brônquico humano de portadores de fibrose cística por meio da
técnica fotoacústica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - da Universidade do Vale do Paraíba como complementação dos créditos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Luis Vicente Franco de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Acosta-Avalos

São José dos Campos – SP
2006

A padronização utilizada neste trabalho segue a Normalização de Dissertações e Teses da UniVap. <http://www.univap.br/Institutos/IPD/Normas-2004.pdf>

J94m

Junqueira, Cristiane Ribeiro de Andrade
Monitoramento da interação de substâncias mucoativas em muco brônquico humano de portadores de fibrose cística por meio da técnica fotoacústica / Cristiane Ribeiro de Andrade Junqueira. São José dos Campos: UNIVAP, 2006.
88f.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Fibrose Cística 2 Fotoacústica 3. Reologia 4. Fisioterapia respiratória I. Oliveira, Luís Vicente Franco, Orient. II. Avalos, Daniel Acosta, Co-Orient. III. Título

CDU:615.816.2

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Aluna: 

Data: 30/6/2006

**“MONITORAMENTO DA INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS MUCOATIVAS EM MUCO
BRÔNQUICO HUMANO DE PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA POR MEIO DA
TÉCNICA FOTOACÚSTICA”**

Cristiane Ribeiro de Andrade Junqueira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **PAULO ROXO BARJA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **LUIS VICENTE FRANCO OLIVEIRA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **DANIEL ACOSTA AVALOS** (UNIVAP)

Prof^a. Dra. **CAROLINA FÚ** (USP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por mais uma das muitas conquistas que já me permitiu alcançar.

Ao Prof. Dr. Luís Vicente F. de Oliveira, que me possibilitou ingressar no mestrado e me despertou ainda mais o interesse pelos trabalhos científicos.

Ao Prof. Dr. Daniel Acosta-Avalos, pela serenidade, incentivo e apoio em todos os momentos deste trabalho.

À colega Fernanda Marciano, pelo seu grande empenho e ao Prof. Dr. Paulo Roxo Barja, pela contribuição com seus conhecimentos e experiências.

Agradeço imensamente a meu esposo e minha filha pela grande compreensão nos momentos de ausência.

A minha família sempre disposta a me acolher nos momentos de cansaço e desânimo.

A todos os colegas de trabalho que me apoiaram e incentivaram no aperfeiçoamento profissional, especialmente a Rita de Cássia grande companheira neste desafio.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram para a conclusão deste trabalho, mesmo sendo estranhos ofereceram um sorriso, um café, uma noite de sono uma palavra de apoio.

De todo meu coração *muito obrigado !*

**Dedico este trabalho aos portadores de fibrose cística,
que na sua luta pela vida me ensinaram o valor de cada amanhecer.**

**“O domínio de uma profissão não exclui o seu aperfeiçoamento.
Ao contrário, será mestre quem continuar aprendendo.”**
Pierre Feuter

Monitoramento da interação de substâncias mucoativas em muco brônquico humano de portadores de fibrose cística por meio da técnica fotoacústica

RESUMO

A fibrose cística é a doença hereditária potencialmente letal mais comum na raça branca. A alteração genética causa mau funcionamento nos canais de cloro das células epiteliais, acometendo vários órgãos e sistemas. Em mais de 90% dos casos o acometimento pulmonar é o fator que determina o prognóstico. No pulmão o muco espesso é a primeira e principal característica clínica da fibrose cística. O uso de substâncias mucolíticas é comum no sentido da manutenção da higiene brônquica. O presente estudo teve como objetivo monitorar pela técnica fotoacústica a interação de drogas mucoativas no muco de portadores de fibrose cística e mensurar o tempo de interação do muco com a substância mucoativa. Foram coletadas amostras de muco brônquico de 10 voluntários portadores de fibrose cística, divididas em três grupos e submetidas respectivamente a nebulização com solução salina hipertônica (SSH) a 3%, 6% e N-acetilcisteína. O resultado do estudo encontrou um tempo médio de interação de 20 minutos no grupo que usou SSH 3%, um tempo médio de interação de 23 minutos no grupo que usou SSH 6% e no grupo que foi nebulizado com N-acetilcisteína o tempo médio foi de 15,4 minutos. Não houve diferença significativa no tempo de interação entre os grupos, com um comportamento não homogêneo nas amostras do grupo submetido a SSH 6%.

Palavras chave: fibrose cística, técnica fotoacústica, solução salina hipertônica, reologia do muco.

Monitoring by the interaction of the mucolytic active substance in the sputum of patients with cystic fibrosis by the photoacoustic techniques

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (FC) is the most common potentially fatal autosomal recessive disorder in white people. The genetic disorder causes defective chloride channel in epithelial cells, striking different organs. In more than 90% of all patients the pulmonary involvement is the life-limiting factor. In the lung, the production of viscous sputum is a main and early clinical feature of Cystic Fibrosis. To help clear the lungs from this material mucolytic active drugs are used. The present study has the aim to monitor by the photoacoustic techniques the interaction of the mucolytic active substance in the sputum of patients with Cystic Fibrosis and to measure the interaction time of the sputum with the mucolytic substance. The bronchial mucus samples were collected from 10 volunteers with CF, divided in 3 groups and respectively nebulized with hypertonic saline (HS) 3%, 6% and N-acetilcisteine. The results obtained show average times of 20 minutes to the time velocity peak in the group which used HS 3%, mean time of 23 minutes in the group which used HS 6% and in the group which used N-acetilcisteine the mean time was of 15,4 minutes and there was not a significant difference in the interaction time of the groups and the group nebulized with HS 6% had the most variable behavior.

Key words: cystic fibrosis, photoacoustic technique, hipertonic saline solution, rheology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fisiopatogenia da Fibrose Cística.....	13
Figura 2- Corte transversal da câmara fotoacústica	33
Figura 3- Célula fotoacústica de duas faces.....	33
Figura 4- Participação do calor gerado devido absorção da radiação.....	34
Figura 5- Corte transversal da célula fotoacústica com muco.....	43
Figura 6 -Diagrama de blocos do arranjo experimental	44
Figura 7- Arranjo experimental utilizando a célula fotoacústica de duas faces.....	44
Figura 8- Conjunto de célula fotoacústica com nebulizador acoplado.....	45
Figura 9- Esquema representativo do procoloto experimental	46
Figura 10- Função Logística e sua derivada	48
Figura 11- Sinal fotoacústico em função do tempo.....	49
Figura 12- Dispersão dos valores de Δt	53
Figura 13- Distribuição dos valores médios e desvio padrão de Δt	54
Figura 14- Dispersão dos valores de t_0	55
Figura 15- Distribuição dos médios e desvio padrão de t_0	56
Figura 16- Dispersão total dos valores de Δt e t_0	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média e desvio padrão (DP) dos tempos correspondentes (ΔT) em minutos de todas amostras.....	53
Tabela 2- Valores de media e desvio padrão de ΔT dos três grupos estudados .	54
Tabela 3- Média e desvio padrão (DP) dos tempos correspondentes (t_0) em minutos de todas amostras.....	55
Tabela 4- Valores de média e desvio padrão de t_0 dos três grupos estudados.....	56
Tabela 5- Caracterização das amostras antes e após nebulização.....	62

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Cl^- : íons cloro

CO: monóxido de carbono

CO₂: dióxido de carbono

c : calor específico da amostra

cm²: centímetro quadrado

DNA: ácido desoxirribonucléico

e_{ar} : energia luminosa do ar

e_{am} : energia luminosa da amostra

f : frequência de modulação da luz

FC: Fibrose cística

G' : módulo de elasticidade

GMP: guanidina monofosfato

Hz: Hertz

IgA: imunoglobulina do tipo A

K^+ : íons potássio

k : condutividade térmica da amostra

Kgf: quilogramas-força

mm: milímetros

MMAD: diâmetro aerodinâmico médio da massa

m³: metros cúbicos

mL: mililitros

NaCl: cloreto de sódio

N: nitrogênio

Na: sódio

PAS: espectroscopia fotoacústica

pH: potencial de hidrogênio iônico

PVC: policloreto de vinila

rhDNase I: desoxirribonuclease recombinante humana I

S_0 : constante de amplitude

V: volts

W: watts

α : difusividade térmica

α_{ar} : difusividade térmica do ar

α_{am} : difusividade térmica da amostra

ε : efusividade térmica

Φ : fluxo de radiação

Φ_{am} : fluxo de radiação sobre a amostra

Φ_{ar} : fluxo de radiação do ar

μm : micrômetro

μ : comprimento de difusão térmica do meio

μ_{ar} : comprimento de difusão térmica do ar

μ_{am} : comprimento de difusão térmica da amostra

η' : viscosidade dinâmica

ρ : densidade da amostra

SUMÁRIO

1 Introdução.....	01
2 Aparelho Mucociliar.....	05
3 Fibrose Cística.....	11
4 Drogas Mucoativas.....	17
5 Aerossolterapia.....	20
6 Propriedades reológicas do muco.....	24
6.1 Transporte mucociliar no palato de rã	26
6.2 Transporte na máquina de tosse	27
6.3 Ângulo de Adesão	28
6.4 Microrrêometro magnético	28
7 Fotoacústica.....	30
7.1 Célula fotoacústica de duas faces.....	32
8 Objetivos	36
9 Material e métodos.....	38
9.1 Caracterização da amostra.....	39
9.2 Protocolo experimental.....	42
9.2.1 Confeção dos corpos de prova.....	42
9.2.2 Montagem fotoacústica	43
9.3.3 Análise estatística.....	50
10 Resultados e discussão.....	51
11 Conclusão.....	64
Referências	66
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	72
Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	74

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) do pâncreas ou mucoviscidose é a exocrinopatia, potencialmente letal, mais comum na raça branca (ROSOV, 1999). Quando os primeiros fibrocísticos foram reconhecidos, a quase totalidade falecia ainda no primeiro ano de vida. Atualmente, com o diagnóstico precoce, o manejo multiprofissional em centros especializados e o acesso à terapêutica adequada cerca de metade dos pacientes sobrevivem até a terceira década de vida. (DOULL, 2001).

A disfunção das glândulas exócrinas é a característica patogênica predominante, observam-se alterações no transporte de eletrólitos através da membrana apical das células epiteliais, resultando em secreções mucosas espessas e viscosas. Esta alteração na característica do muco geralmente causa obstrução dos ductos e canalículos secretores de diversos órgãos levando a tríade clássica desta doença: doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), eletrólitos anormalmente elevados no suor e insuficiência pancreática (IP).

Embora todas as glândulas exócrinas sejam afetadas e o desenvolvimento da doença varie dependendo de cada sistema envolvido é o acometimento pulmonar que prediz o prognóstico e confere o grau de morbidade e mortalidade. A combinação de muco viscoso com o processo de limpeza do aparelho respiratório conhecido como *clearance* mucociliar diminuído determinam os fenômenos obstrutivos que predispõe a constantes infecções, as quais contribuem para piora da função pulmonar e eventual óbito (SURI, 2005).

A FC é uma doença grave e de difícil manejo clínico, onde o uso de mucolíticos é permanente e de extrema importância na melhora da condição do muco, facilitando sua retirada das vias aéreas. Os estudos de Robinson (1996), utilizando a solução salina hipertônica (SSH) a 7%, e King (1996), utilizando menor concentração, 3%, mostraram melhoras significativas da função pulmonar. Contradizendo estes estudos, Pizzichini (2002) e Scheicher (2003), demonstraram um risco de broncoespasmo em 20% dos pacientes que fizeram uso de solução salina hipertônica com concentração maior que 4,5% e um declínio da função pulmonar e maior colonização bacteriana devido ao uso prolongado de soluções hipertônicas.

Assim, a proposta desta pesquisa é verificar a interação de drogas mucoativas com muco brônquico de fibrocísticos através da técnica fotoacústica e discutir esta interação comparando com outras técnicas de estudo de muco descritas na literatura e ainda com a prática clínica.

De acordo com o Consenso de Fibrose Cística (1999), o tratamento após o diagnóstico envolve desde a terapia medicamentosa até cuidados com alimentação e higiene brônquica. Embora a atenção a esta afecção seja multiprofissional e englobe várias abordagens terapêuticas, este trabalho abordará apenas a terapêutica dos mucolíticos através do estudo do muco brônquico pela técnica fotoacústica. A escolha pela solução salina 3% , 6% e a N-acetilcisteína foi feita pelo baixo custo e muitas controvérsias na literatura sobre a seleção e resposta de mucolíticos a longo prazo (SPENCER, 2003; WARK, 2005).

A técnica fotoacústica baseia-se na produção de ondas acústicas em uma câmara fechada contendo ar em contato com material analisado. A amostra é exposta a uma luz monocromática em uma determinada frequência de modulação, absorção de luz modulada gera ondas acústicas produzindo oscilações de pressão responsáveis pelo sinal fotoacústico (GUTIERREZ-JUAREZ, *et al.*, 2002; TAM, 1986).

O processo fotoacústico depende não somente de propriedades ópticas da amostra, mas também de propriedades térmicas, como efusividade e difusividade, e algumas vezes de propriedades elásticas. Este método permite monitorar as alterações destas propriedades em função do tempo, enquanto a amostra é exposta a esta luz modulada, e também quando a mesma é submetida a processo químico através de contato com outra substância reagente. (ROSENCWAIG, 1980)

Para caracterização de algum material, uma ampla variedade de propriedades físicas podem ser consideradas incluindo as propriedades térmicas. As técnicas fototérmicas têm sido úteis na caracterização de diversos materiais, como cristais, líquidos, gases e também materiais biológicos.

A técnica fotoacústica permite que se selecione a espessura da amostra a ser estudada, conforme a frequência de modulação da luz incidente. Estas características de análise

permitem o estudo de tecidos biológicos, o que vem ocorrendo de forma crescente nos últimos anos (BERNENGO, 1998; GUTIERREZ-JUAREZ *et al.*, 2002).

2 APARELHO MUCOCILIAR

2 APARELHO MUCOCILIAR

O sistema respiratório representa um dos alvos principais dos efeitos adversos decorrentes da poluição atmosférica. As vias aéreas estão continuamente expostas a diversos agentes tóxicos do ar, incluindo gases, material particulado e microrganismos, sendo os mecanismos de defesa pulmonar realizado através do condicionamento, filtragem e limpeza do ar inspirado (HOUTMEYERS *et al.*; 1999).

Um desses mecanismos é o aparelho mucociliar da árvore brônquica que tem três mecanismos de defesa envolvidos na proteção das vias aéreas. O primeiro serve como uma barreira mecânica por “capturar” partículas da superfície líquida que cobre o epitélio das vias aéreas e limpando-as desde a árvore traqueobrônquica através da ação ciliar. Segundo, o líquido da superfície age como uma barreira química, por exemplo, o muco da cavidade aérea que tem propriedades antioxidantes. E finalmente, os líquidos de superfície que proporcionam uma função de barreira biológica através de interação com microrganismos e células inflamatórias luminais impedindo a migração dos mesmos ao longo do epitélio das vias aéreas (WANNER *et al.*; 1996).

Entende-se por condicionamento uma série de eventos fisiológicos que têm por finalidade aquecer, umedecer e depurar substâncias e partículas inaladas. A função de condicionamento é realizada por alguns segmentos das vias aéreas superiores como, por exemplo, o nariz, a boca e a faringe. A traquéia e os brônquios, entretanto, não o fazem, já que sua perfusão é menor quando comparada com a alta perfusão dos tecidos da boca, nariz e faringe (SALDIVA, 1990).

No condicionamento do ar em climas frios ou temperados, o calor e a água são transferidos da mucosa das vias aéreas para o ar inspirado (o calor por convecção turbulenta e a água por evaporação) esfriando a mucosa. Durante a expiração, parte do calor e do vapor d'água retorna a mucosa, proveniente do gás alveolar. Desta maneira, as vias respiratórias condicionam o ar para proteger os pulmões e posteriormente conservam o calor e a água do corpo, reabsorvendo parte deles durante a expiração.

O mecanismo de filtração do ar envolve a deposição de partículas na camada mucosa das vias aéreas e está relacionado com as dimensões das partículas inaladas, de modo que quanto maior o volume delas, maior será sua deposição nas vias aéreas superiores. A anatomia das vias respiratórias favorece a deposição devido às angulações sucessivas observadas desde a nasofaringe até as bifurcações bronquiolares (ZIN; ROCCO, 1999).

Ainda segundo Zin e Rocco (1999), a presença de pêlos nasais, a própria anatomia da faringe, língua e laringe e a propensão de uma corrente aérea do tipo turbilhonar, favorecem uma maior deposição de material nas vias aéreas de maior calibre. Estes elementos funcionam como filtro na manutenção da integridade das vias aéreas inferiores.

Uma variedade de partículas diferentes, tais como bactérias, vírus e agentes da poluição ambiental são depositados no pulmão enquanto respiramos. Uma série de sistemas de defesa, denominados de *clearance* operam no pulmão no sentido de remover o material inalado e depositado assim como os debris para manter a via aérea relativamente limpa e estéril (HOUTMEYERS *et al.*, 1999; SALDIVA, 1999).

O aparelho mucociliar, compreendendo os cílios, o líquido periciliar e o muco, representa o principal mecanismo de defesa do sistema respiratório contra os agentes nocivos contidos no ar. Esta ação é baseada no mecanismo de encaixe entre o muco das vias aéreas e os cílios, que causam um fluxo ascendente deste muco em direção a laringe onde o mesmo pode ser deglutido (JARDIM *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 1992).

Relacionando as ações distintas deste aparelho, Lorenzi Filho *et al.* (1992), descreveram que a eficiência do *clearance* mucociliar depende da magnitude do funcionamento dos cílios, determinada pelo comprimento, densidade e frequência dos seus batimentos, da quantidade de muco e do líquido periciliar, além das propriedades viscoelásticas deste muco.

O revestimento do trato respiratório também possui papel importante neste sistema de defesa. O epitélio colunar pseudoestratificado desde o terço posterior das fossas nasais até os bronquíolos terminais, com exceção da área olfativa da laringe e parte da faringe, que são recobertas por um epitélio escamoso.

Cada célula ciliada deste epitélio contém cerca de 200 cílios de tamanho uniforme, com comprimento de 6 μm e diâmetro de 0,3 μm o confere uma grande área de captação de impurezas nas vias aéreas (JARDIM *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2001; WANNER *et al.*, 1996).

Houtmeyer *et al.* (1999), descreveram que os cílios são prolongamentos citoplasmáticos que evidenciam em corte transversal, nove pares de microtúbulos periféricos interligados por pontes de dineína e nexina (estruturas protéicas importantes para a motilidade ciliar), ao redor de um par central. As pontes de filamentos radiais de dineína unem os pares periféricos aos centrais, e as pontes de nexina ligam os pares periféricos entre si, conferindo motilidade e também resistência ao conjunto.

Segundo Santos *et al.* (2001), o movimento ciliar resulta da interação dos braços de dineína com o microtúbulo adjacente, dividido em uma fase de batimento efetivo e uma segunda fase de batimento de recuperação. Geralmente, os cílios de um epitélio ciliado normal movem-se de forma simétrica, rápida e com frequência aproximada de 12 hertz na traquéia e 8 hertz nos bronquíolos que é necessária para deslocar a secreção que reveste o epitélio respiratório que é formada por duas camadas distintas, uma chamada de hipofase sol (camada inferior e mais líquida) e outra, epifase gel (camada superior e altamente viscoelástica). O líquido periciliar da camada sol não tem propriedades semelhantes ao gel e distribui-se da traquéia até os bronquíolos em uma camada contínua, com espessura de 6 μm aproximadamente (DANEL, 1996; JARDIM *et al.*, 1999; MAJIMA, 2002).

A secreção das vias respiratórias é formada a partir de células secretoras das glândulas submucosas (células mucosas e serosas), de células do epitélio das vias aéreas denominadas de células caliciformes (*goblet cells*) e de células de clara. A epifase gel, composta pela secreção de muco, é tida como produto das células mucosas e caliciformes, enquanto o líquido periciliar da hipofase sol é produto das células de clara e células serosas (DANEL, 1996; MAJINA, 2002; VAN DER SCHANS *et al.*, 1996; ZIN; ROCCO, 1999).

Saldiva (1990) comenta também que as células mucosas, responsáveis pela produção da fração mais viscosa da secreção respiratória, podem produzir diferentes tipos de glicoproteínas que estabelecem justamente a condição de viscoelasticidade desse fluido.

O autor ainda descreve que as células serosas, produtoras do líquido periciliar, exercem papel importante nos processos irritativos das vias aéreas, isto porque elas secretam a imunoglobulina A brônquica, além de lisozima, lactoferrina, peroxidase e outras substâncias que exercem papel citoprotetor.

O mecanismo que regula a quantidade da produção das duas camadas que compõem a secreção respiratória influencia diretamente o acoplamento dos cílios e do muco. Apesar deste mecanismo ainda não estar totalmente estabelecido, há indícios que a regulação da quantidade de fluido da hipofase sol está relacionada com o estado funcional dos canais iônicos para sódio e cloro e que a secreção da epifase gel, pode ter relação com estímulos colinérgicos, alfa e beta adrenérgicos, histamina, prostaglandinas, AMP, GMP e íons cálcio (SALDIVA, 1990; ZIN; ROCCO, 1999).

O muco brônquico é um fluido heterogêneo constituído principalmente de água (cerca de 95%) juntamente com eletrólitos, aminoácidos, carboidratos e macromoléculas. Conforme já comentado anteriormente, as glicoproteínas, também denominadas mucinas, são responsáveis pela viscosidade do muco e correspondem de 1% a 2% de sua composição. No muco brônquico existe adicionalmente um significativo acúmulo de lipídios e em condições patológicas, ácido desoxirribonucléico (DNA) podem estar presentes. Também fazem parte da composição do muco substâncias antioxidantes, proteases, imunoglobulinas, enzimas como lisozima e lactoferrina, peroxidases diversas, além de proteínas plasmáticas como a albumina (HUOTMEYER *et al.*, 1999; JARDIM *et al.*, 1999; VANS DER SCHANS *et al.*, 1996).

Segundo Houtmeyers *et al.* (1999), o *clearance* mucociliar é a função mais amplamente estudada do muco respiratório, sendo basicamente realizado por dois processos, um denominado de efetivação do aparelho mucociliar e o outro pela tosse.

Com relação à função do aparelho mucociliar, existe uma discussão no mecanismo de *clearance* acerca da verdadeira função do líquido periciliar. Ainda não está estabelecido se o seu papel é o de permitir um adequado funcionamento dos cílios, já que está em íntimo contato com os mesmos e é um líquido de baixa viscosidade, ou se serve apenas para governar a função do muco (JARDIM *et al.*, 1999; SALDIVA, 1990).

A composição iônica deste líquido ainda não está bem estabelecida, entretanto os seus constituintes iônicos podem ser mensurados por um filtro de papel ou através de eletrodos *in vivo*. O líquido da superfície das vias aéreas dos humanos é levemente hiposmolar, contendo menor quantidade de Na^+ e Cl^- do que no plasma e, maior quantidade de K^+ , sendo levemente ácido. Acredita-se que este líquido seja regulado pelo transporte iônico envolto das células epiteliais com uma transferência passiva desse fluido (WANNER *et al.*, 1996).

De qualquer forma, Hardey (1994), descreve que o componente ciliar do *clearance* está relacionado não só com a estrutura, mas também com a função dos cílios, e que para a ocorrência de uma ação efetiva no transporte das partículas que se depositam nas vias aéreas, é necessário um perfeito acoplamento entre os cílios e o líquido periciliar.

Os cílios normais estão presentes sobre a superfície luminal do epitélio respiratório e são extrinsecamente ativos, batendo em uma única direção para mover o muco em direção à orofaringe para ser deglutido (JARDIM *et al.*, 1999).

3 FIBROSE CÍSTICA.

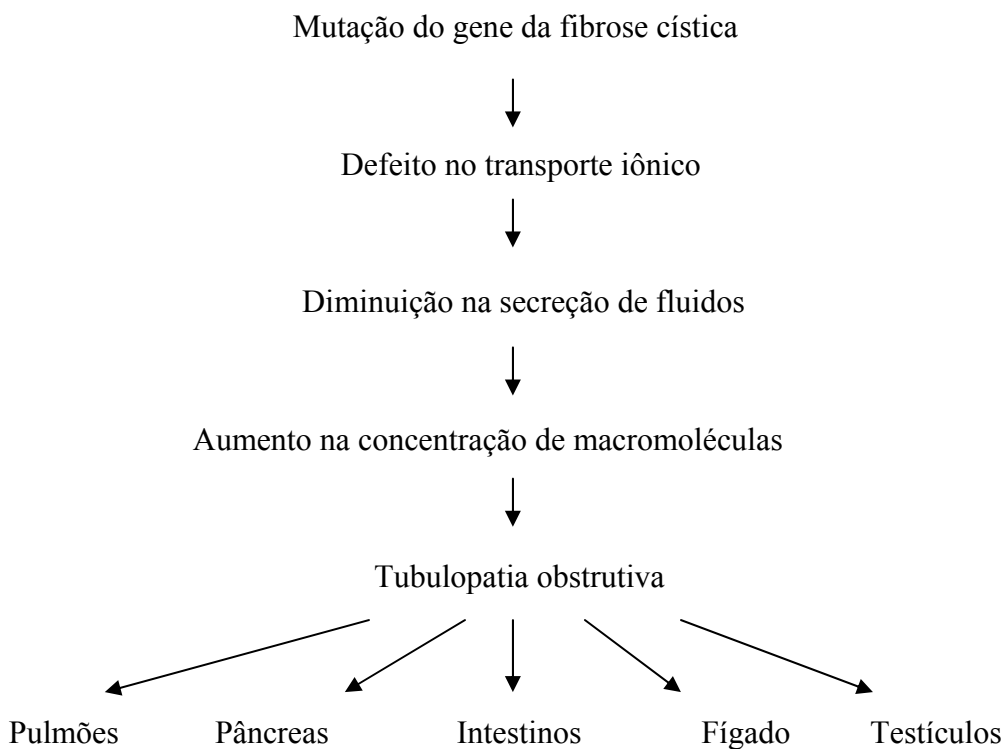
A fibrose cística (FC), também conhecida como mucoviscidose, é uma desordem hereditária autossômica recessiva que acomete vários sistemas glandulares. Esta doença, geralmente fatal na infância ou na idade de adulto jovem, é caracterizada principalmente por comprometimento broncopulmonar progressivo, deficiência pancreática e alterações eletrolíticas do suor (ELKINS, 2006; ROSE, 2002).

A expectativa de vida para indivíduos com FC tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas. Há vinte anos, os indivíduos com FC sobreviviam até a adolescência, mas o diagnóstico precoce e os tratamentos mais agressivos têm estendido a expectativa de vida até a idade adulta. Para as crianças nascidas na década de 90, a sobrevivência média está predita aproximadamente para os 40 anos. A doença pulmonar na FC é responsável por mais de 95% da mortalidade e morbidade. Entre os adultos, 53% são homens e 46% são mulheres. Estima-se que a etnia caucasiana chega a ser acometida em 93,7%, os hispânicos em 3,2%, os negros norte-americanos em 2,7% e 0,4% de indivíduos de outras etnias são acometidos (RASKIN, 1993).

O gene da FC localiza-se no braço longo do cromossomo 7, no locus q31, é formado por 250 quilobases de DNA, com 27 exons, e tem a propriedade de codificar um RNAm de 6,5 quilobase, que transcreve uma proteína transmembrana reguladora do transporte iônico composta de 1.480 aminoácidos, conhecida como CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Também chamada de canal de cloro é sintetizada no núcleo, sofre maturação em organelas citoplasmáticas (fosforização e glicosilação), localizando-se na membrana apical das células. A CFTR é essencial para o transporte iônico através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de Cl^- , Na^+ e água. Algumas centenas de mutações foram descritas no gene da FC, porém mais frequentemente ocorre uma deleção de três pares de bases, acarretando a perda de um aminoácido (fenilalanina) na posição 508 (ΔF508) da proteína CFTR, e isto impede seu funcionamento adequado. Aproximadamente 70% dos cromossomos da FC, no norte da Europa, tem mutação ΔF508 , cuja incidência diminui para o centro e sul da Europa (RATJEN, 2003)

No Brasil, Martins & Ribeiro (1993) encontraram 33% desta mutação em São Paulo, e Raskin *et al* (1993) encontraram 49% no Rio Grande do Sul, 27% em Santa Catarina e 52 % em São Paulo.

A presença de dois alelos com mutações no gene da FC provoca ausência de atividade ou funcionamento parcial da CFTR causando redução na excreção natural de Cl^- aumentando a eletronegatividade intracelular. Com isto, resulta em maior fluxo de Na^+ para preservar o equilíbrio eletroquímico e, secundariamente, de água para a célula por ação osmótica. Ocorre então, desidratação das secreções mucosas e aumento da viscosidade, favorecendo a obstrução dos ductos, o que favorece o desenvolvimento de reações inflamatória e posteriormente fibrose (ROSE, 2002). Em 2002 Ribeiro esquematizou a base fisiopatológica de FC visualizada na figura abaixo.



(FONTE: RIBEIRO, 2002)

Figura 1: Fisiopatogenia da fibrose cística.

O acometimento do aparelho respiratório é progressivo e de intensidade variável. O curso clínico é determinado por muco viscoso e *clerance* mucociliar diminuído, predispondo à sinusite, bronquite, pneumonia, bronquiectasia, fibrose e falência respiratória. Os pulmões são normais intra-útero e nos primeiros meses de vida, exceto por pequenas dilatações e hipertrofia das glândulas submucosas da traquéia. As alterações se iniciam nas pequenas vias aéreas (DONALDSON, 2006; DORNELAS *et al.*, 2000; SURI, 2005).

A colonização bacteriana secundária à retenção de secreção favorece a metaplasia do epitélio brônquico, impactação mucóide periférica e desorganização da estrutura ciliar. Formam-se rolhas muco purulentas nos brônquios e nos bronquíolos, com inflamação linfocitária aguda e crônica (KNOWLES, 1986).

O envolvimento parenquimatoso é menos freqüente, mas podem ocorrer pneumonias de repetição, principalmente em pacientes jovens. Com a evolução, formam-se bronquiectasias, geralmente após o segundo ano de vida, preferencialmente nos lobos superiores, decorrentes da incapacidade do paciente esterilizar o trato respiratório e suprimir o processo inflamatório endobrônquico (TOMASHESKI, 1986).

As bronquiectasias favorecem colapso das vias aéreas, aprisionamento de ar e áreas focais de pneumonias hemorrágicas. A hipóxia leva a alterações da vasculatura pulmonar, dilatação das artérias brônquicas e neoformações vasculares próximas às áreas de bronquiectasias. Estas predispõem à ocorrência de *shunt* pulmonar, e a ruptura desses vasos pode levar a hemorragia pulmonar. As complicações incluem hemoptises recorrentes, impactações mucóides brônquicas, atelectasias, empiema, enfisema progressivo, pneumotórax, fibrose pulmonar, osteopatia hipertrófica e *cor pulmonale*.

A doença evolui em praticamente 100% dos fibrocísticos para *cor pulmonale*, ou seja, acometimento cardíaco. Nas fases avançadas, os pacientes apresentam tórax em tonel, broncorréia purulenta, principalmente matinal, freqüência respiratória aumentada, dificuldade expiratória, cianose periungueal e baqueteamento digital acentuado. Nessa fase queixam-se de dispnéia durante ao exercício que evolui para dispnéia ao repouso (ROZOV, 1999).

O acometimento pulmonar na FC é caracterizado pela colonização e infecção respiratória por bactérias levando a dano tissular irreversível. Os microrganismos, na maioria das vezes, aparecem nas vias aéreas na seguinte ordem: *Staphylococcus áureos*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa mucóide*, *Pseudomonas cepacea* e *Burkholderia cepacia*. Geralmente, o *S. áureos* e o *H. influenzae* são encontrados precocemente, mesmo antes do aparecimento dos sintomas. A colonização por *Pseudomonas aeruginosa* é muito difícil de ser erradicada, mesmo com uso de antibióticos. Os fibrocísticos não apresentam deficiências imunológicas, os quadros de infecções de repetição do trato respiratórios não aparecem em outros órgãos.

As duas hipóteses para doença pulmonar na FC baseiam-se na falta ou defeito da CFTR, que causaria desidratação do muco e diminuição da atividade mucociliar, favorecendo a infecção. A segunda hipótese sugere que a falta ou defeito da CFTR resulta em elevada concentração de sais nas vias aéreas, inibindo a ação de defensinas (incluindo peptídeos antibacterianos e as defensinas humanas beta 1 e 2) que destroem as *pseudomonas*. Contra esta teoria, existe o fato observado na discinesia ciliar, que apresenta alteração mucociliar muito mais grave que a FC, mas a infecção por *P.aeruginosa* é menos freqüente e só ocorre tardiamente. Este é o mecanismo justificado em muitos estudos para não se utilizar por longos períodos às soluções hipertônicas pela via inalatória na FC, que por sua vez, poderiam facilitar a colonização e dificultar o mecanismo defensivo (ALBERTINI-YAGI, 2005; DOULL, 2001; MILLA, 1998; RATJEN, 2003; ROSE, 2002).

Estudos *in vitro* mostram que as *pseudomonas* aderem com mais intensidade e facilidade nas células do epitélio das vias aéreas de pacientes com FC que nas células de indivíduos saudáveis. Na última década, a utilização do lavado brônquio-alveolar (LBA) tem permitido o entendimento do processo inflamatório e infeccioso nos fibrocísticos. Substâncias quimioatraentes originárias do hospedeiro (IL8) e de bactérias (produtos bacterianos solúveis) provocam migração intensa de neutrófilos aos pulmões. A presença de neutrófilos em número elevado causam liberação de elastase e grande quantidade de DNA no muco, bem como o aparecimento de substâncias pró-inflamatórias, IL1, IL6, IL8 e fator de necrose tumoral, que tem sido identificadas no escarro dos fibrocísticos (MULHEBACH, 1999).

A assistência multiprofissional é importante no tratamento e prevenção da deterioração da função respiratória incluem na rotina terapêutica da FC o uso de antibióticos, antiinflamatórios, fisioterapia respiratória e o uso de fármacos protussígenos, onde, existe considerável confusão no termo mais adequado para designar o medicamento com finalidade muco ativa.No próximo capítulo classificaremos essas substâncias. (SPENCER & JAFFE, 2003).

4 DROGAS MUCOATIVAS

O tratamento farmacológico da tosse é amplo e tem vários aspectos a serem estudados e discutidos, tanto em relação à forma de administração quanto à dosagem e efeitos. Existem duas categorias de tratamento para tosse os antitussígenos para controle, prevenção ou eliminação da tosse e os protussígenos que tornam a tosse mais efetiva. O tratamento antitussígeno ideal busca eliminar a causa da tosse, como os antibióticos, broncodilatadores e drogas de ação antiinflamatórias das vias aéreas; a despeito de tal informação os protussígenos são amplamente empregados e sujeitos a críticas na literatura (KIM, 1982).

Existe considerável confusão no meio clínico quanto à utilização do termo mais adequado para designar os medicamentos com finalidade pró tussiva, em 1994 foi feita uma revisão dos termos utilizados com o intuito de organizar as definições (*Task Group on Mucoactive Drugs*), estipulando como:

Mucoativo – medicamento que afetam de alguma maneira a qualidade ou quantidade do muco;

Mucolítico – medicamento que atua destruindo a mucina ou a fase gel do muco;

Mucocinético – medicamento que acelera o transporte do muco por ação ciliar ou por tosse;

Expectorantes – medicamentos que, de alguma maneira, promove eliminação do muco das vias aéreas pela tosse;

Secretagogos – medicamentos que estimula a secreção do muco.

Embora esta classificação facilite o entendimento da ação deste grupo de medicamentos, ainda permite conflitos como uma substância pertencer a dois grupos ou mesmo tempo, como, por exemplo, ser secretagogo e expectorante. Especificamente nos portadores de FC o uso de alguma forma de protussígeno é freqüente, devido à evolução do quadro pulmonar.

O uso de drogas mucoativas busca maximizar a depuração mucociliar do escarro, levando o muco a um nível ideal de elasticidade e viscosidade para ser eliminado, o que vai ocorrer com a escolha certa da droga mucoativa. Em FC são mais utilizados e comparados em vários estudos a solução salina hipertônica que oferece baixo custo e tem demonstrado benefícios a função pulmonar em curto prazo, entretanto, existem dúvidas quanto a sua concentração ideal, tempo de inalação e prejuízos a longo prazo no que diz respeito às defensas do pulmão.

A outra droga de excelência é a Desoxirribonuclease humana recombinante-Dornase alfa (rh-DNase) que é uma proteína glicolisada recombinante humana que, embora os benefícios do seu uso em longo prazo permaneçam controversos, ensaios clínicos randomizados e controlados têm mostrado melhora na função pulmonar e redução nas exacerbações, mas esta melhora não é encontrada de forma uniforme em todos os pacientes e em comparação com custo de outras drogas mucoativas é cara para realidade do nosso país (ALBERTINI-YAGI,2005; BALLAMANN, 2002; PAGGIARO, 2002 PIZZICHINI, 2002; RATJEN, 2003; SPENCER ; JAFFE, 2003 SURI, 2002).

5 AEROSOLTERAPIA

A terapia do aerossol é conhecida e praticada desde a Antiguidade. Ela foi usada de forma muito mais intensa quando não havia tantas formas orais e intravenosas de administrar medicamentos, porém nos últimos anos voltou a ser uma via de grandes possibilidades terapêuticas. Os β_2 -adrenérgicos representam provavelmente a classe de medicamentos mais prescrita, seja sob a forma de medidores de aerossol, de pó para inalação ou solução para vaporização.

Os anticolinérgicos e os corticóides existem também sob diferentes formas. Os outros medicamentos, como os antibióticos, são administrados por vaporização na FC. A eficiência do tratamento por terapia do aerossol depende não apenas do princípio ativo do medicamento, mas também do depósito do aerossol nas vias respiratórias. Podemos definir como terapia aerossol um sistema de partículas cujo diâmetro é suficientemente pequeno para que fiquem suspensos no ar. Essas partículas de diferentes tamanhos podem ter formas diversas e ser de natureza sólida (pó) ou líquida (gotículas).

O local de depósito do aerossol nas vias respiratórias depende principalmente de suas propriedades aerodinâmicas. Essas propriedades são determinadas pelo tamanho e densidade das partículas que constituem o aerossol. Para caracterizar o tamanho, o peso, a forma e a densidade das partículas, definimos o diâmetro aerodinâmico equivalente (Dae). O diâmetro aerodinâmico é o diâmetro de uma esfera que tenha a mesma velocidade na queda que a partícula e uma massa específica de 1 g/cm³. O aerossol medicamentoso é freqüentemente polidispersado, isso é, constituído de partículas de tamanhos diferentes. Para interpretar estatisticamente essa distribuição por tamanho das partículas é utilizado o diâmetro aerodinâmico médio da massa (MMAD).

O MMAD é o diâmetro que divide a massa do aerossol em duas metades igualmente divididas de uma parte e de outra do MMAD. Esse parâmetro condiciona o local de depósito do aerossol nas vias aéreas. A penetração e o depósito do aerossol nas vias aéreas são funções das propriedades físicas do aerossol, das condições de inalação e da anatomia das vias respiratórias (PAGGIARO, 2002; NONE *et al.*, 2005).

As recomendações para uma boa prática de terapia de aerossol definem os locais de depósito na árvore respiratória segundo o tamanho das partículas. O depósito se faz de preferência na esfera Otorrinolaringológica (ORL) para as partículas cujo tamanho é superior a 5 μm de diâmetro aerodinâmico, nos brônquios para as partículas compreendidas entre 2 e 6 μm de diâmetro aerodinâmico e no pulmão profundo para as partículas compreendidas entre 0,5 e 3 μm de diâmetro aerodinâmico.

As partículas finas são compreendidas entre 0,6 e 0,3 μm de diâmetro aerodinâmico, que do tamanho ideal para o depósito na via aérea, e as partículas extrafinas são inferiores a 0,1 μm e são geralmente exaladas. As condições de umidade podem ser muito importantes, por exemplo, nas vias respiratórias onde o ar está saturado de umidade, uma partícula hipertônica aumentará seu tamanho. As propriedades físicas dos aerossóis são determinadas por três parâmetros: o gerador de aerossol, a formulação química que comporta o princípio ativo e o gás vetor. Assim dois vaporizadores diferentes utilizados com o mesmo medicamento poderão dar MMDA diferentes e dois medicamentos diferentes utilizados com o mesmo vaporizador poderão dar aerossóis com propriedades físicas diferentes (DOLOVICH, 2000).

Os modos de inalação pelo o paciente influenciam igualmente o depósito do aerossol. As velocidades das partículas são determinadas pelo gerador e são influenciadas pelo paciente. Uma potência de inspiração muito rápida (0,5 - 2 l/s) aumenta o depósito de aerossol nas vias aéreas superiores. Ao contrário, uma inspiração lenta e profunda diminui o impacto das partículas na esfera ORL e favorece um depósito nas vias respiratórias baixas. Essa inspiração pode ser seguida de uma pausa de alguns segundos para melhorar o depósito periférico. Para os geradores de aerossol que funcionam na fase inspiratória, o tempo de administração do aerossol afeta também o depósito.

Uma baforada dada antes do início da inspiração assegurará um ótimo depósito nas vias aéreas mais baixas enquanto que uma baforada tardia durante a fase de inspiração não terá tempo de penetrar até os alvéolos. Por razões práticas, a inalação do aerossol se faz mais freqüentemente em posição sentada ou em pé. É provável que essa posição favoreça a sedimentação do aerossol em direção a base das vias aéreas em detrimento dos vértices (SCHEICHER, 2003; WILDHALBER *et al*,1998).

A anatomia das vias respiratórias nos pacientes com vias obstruídas modifica consideravelmente a hidráulica do ar inspirado e afeta, portanto o depósito de aerossol. Essa obstrução das vias aéreas impulsiona um aumento da quantidade de aerossol inalado e uma não-uniformidade do depósito nas vias respiratórias. Com um aerossol de 1 μm , a quantidade de aerossol inalado nos pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é duas vezes menor que nos pacientes sadios e ela é muito mais considerável que o grau de obstrução.

Estudos por um conjunto de imagens radioisotópicas praticados em pacientes com DPOC mostraram que o depósito de um aerossol era muito mais proximal e que a obstrução era um fator considerável. Nas crianças onde as vias aéreas são estreitas, o ritmo respiratório rápido associado a uma respiração nasal modifica a penetração e o depósito de aerossol. A cooperação da criança na hora de uma sessão de inalação é difícil e coloca mais problemas específicos. A utilização de uma interface do tipo máscara é então necessária. Essas máscaras são melhores ou piores adaptadas à morfologia da criança e estão na origem de perdas de aerossol por vazamento e por depósito nasal (MICHELL, 1997).

6 PROPRIEDADES REOLÓGICAS DO MUCO

6 PROPRIEDADES REOLÓGICAS DO MUCO

Estudos físico-químicos do muco brônquico tem mostrado que diferentes espécies de proteínas e glicoproteínas são os principais polímeros constituintes do muco, que é uma mistura de macromoléculas ligadas por pontes de dissulfeto e hidrogênio e ligações hidrofóbicas com água, íons e lipídios todos arranjados numa cadeia tridimensional formando um gel (BRAGA, 1988; LEIKAUF *et al.*, 2002).

Braga (1988) ainda descreve que por causa complexa bioquímica e natureza polimérica, o muco brônquico tem um número de propriedades não-lineares e de fluxo tempo-dependente (tixotropia), onde reologicamente é considerado como um material viscoelástico não Newtoniano.

O muco também é considerado como a epifase gel da secreção respiratória, se apresentando como uma substância viscoelástica, ou seja, apresenta propriedades tanto de líquidos como de sólidos. A área da física que investiga as propriedades e o comportamento mecânico dos corpos deformáveis, que não são puramente líquidos ou sólidos, é denominada Reologia (JARDIM *et al.*, 1999; MACCHIONE *et al.*, 1995).

As propriedades viscoelásticas apresentadas pelo muco são a viscosidade, a elasticidade e a espinabilidade. Elasticidade é a propriedade expressa pela capacidade do muco de ser deformado, como um sólido quando uma força é aplicada, armazenando energia. Viscosidade é a propriedade expressa pela capacidade do muco de apresentar fluxo, como um líquido, ao ser submetido a uma força, com dissipação de energia. Espinabilidade corresponde à capacidade específica do muco de ser esticado, alongado, como um fio (HASHIMOTO *et al.*, 2003; HOUTMEYER *et al.*, 1999; JARDIM *et al.*, 1999).

Ainda segundo Houtmeyer *et al.* (1999), além dessas propriedades reológicas, o muco respiratório possui propriedades de superfície que são caracterizadas pela adesividade e *wettability* (tempo de umidificação). Estas propriedades são independentes das propriedades viscoelásticas e determinam a capacidade de proteger, hidratar e lubrificar o epitélio da via aérea subjacente e interferem na sua transportabilidade.

A adesividade é caracterizada pela força de atração entre a superfície aderente e o sistema adesivo. No caso do trato respiratório, o transporte mucociliar envolve a interação entre o muco e os cílios, mostrando que a adesividade corresponde à força necessária para atingir a separação do fluido adesivo (muco) e a superfície aderente (MACCHIONE *et al.*, 1995).

A *wettability* expressa a capacidade do muco se espalhar quando depositado em uma superfície plana. Este espalhamento ocorre porque existe uma interação finita entre a superfície sólida e as moléculas presentes fluido (muco). O grau de *wettability* é caracterizado pelo ângulo de contato ou ângulo de adesão entre a superfície e o fluido (muco) em equilíbrio (HUOTMEYER *et al.*, 1999; MACCHIONE *et al.*, 1995).

O muco é um fluido instável devido a uma propriedade relacionada às suas propriedades reológicas, chamadas tixotropia, que consiste na variação da viscosidade, dependendo da tensão de cisalhamento do estímulo aplicado (JARDIM *et al.*, 1999).

Ao longo dos anos, vários métodos de estudo foram desenvolvidos para análise das propriedades reológicas do muco, a maior parte deles tenta se aproximar das condições encontradas no sistema respiratório, e simular o transporte mucociliar, a tosse e outras condições fisiológicas. A saber:

6.1 TRANSPORTE MUCOCILIAR NO PALATO DE RÃ

O sistema conveniente para o estudo do transporte mucociliar é realizado no palato de rã, que tem um epitélio similar ao das vias aéreas dos mamíferos. Este sistema é viabilizado por um clássico modelo experimental utilizado nos laboratórios que se dedicam a estudar as propriedades reológicas do muco respiratório (BRAGA, 1988; MACCHIONE *et al.*, 1995;).

Para se obter o palato, as rãs são espinhaladas e a porção superior da sua cabeça é removida. O palato é então mantido por 48 horas a 4° C em uma câmara saturada de vapor d'água, para que o muco seja esgotado pela própria ação de seu aparelho ciliar. O muco da rã é coletado para servir de controle em relação ao muco humano coletado que será analisado (SALDIVA, 1990).

O experimento é realizado colocando-se o palato dentro de uma caixa de acrílico que deve ter internamente uma umidade de 100% proveniente de um nebulizador ultra-sônico funcionando com 2/3 de solução salina (6% de NaCl), que é a concentração de sal adequada para a homeostase da rã (LORENZI *et al.*, 1992; PUCHELLE, 1982).

A velocidade de transporte é então aferida pela aposição de uma pequena quantidade de muco (cerca de 5 μ L) sobre o epitélio ciliado do palato da rã. Essa aferição é realizada com uma lupa estereoscópica, com ocular de aumento de 10 vezes e objetiva com aumento de 8 vezes. Assim, pode ser observado e medido o tempo de deslocamento do muco em uma distância constante de 6mm, onde a velocidade do muco teste é expressa em termos de velocidade relativa, que é a velocidade do muco teste dividida pela velocidade do muco da rã. (GASTALDI, 1997; SALDIVA, 1990).

A transportabilidade ciliar foi analisada por Hashimoto *et al.* (2003) para se verificar a influência das propriedades reológicas do muco da via aérea sobre a geração do som da tosse. O enfoque principal deste estudo foi dado na análise do som da tosse seca e da tosse crônica produtiva de alguns indivíduos, porém, a mensuração da transportabilidade ciliar pode mostrar que existe uma correlação negativa entre a melhor nitidez do som da tosse e a efetividade desse tipo de transporte.

6.2 TRANSPORTE NA MAQUINA DE TOSSE

O deslocamento do muco na máquina simuladora de tosse foi estudado por Gastaldi (1997), que utilizou um modelo experimental composto por uma fonte pressórica, uma válvula solenóide e um tubo cilíndrico de acrílico, utilizado como modelo de via aérea.

A fonte de pressão foi constituída por um torpedo de oxigênio com 10 m³, com uma válvula para a manutenção da pressão propulsora de 4,2 Kgf/cm² durante todo o experimento. A saída desta válvula foi conectada a outra válvula do tipo solenóide, com uma abertura de ¼ de polegada, mantida fechada na posição de repouso e aberta durante um tempo estipulado de 1 segundo por meio de um temporizador (GASTALDI, 1997).

Para a realização do experimento, a outra extremidade de válvula solenóide foi conectada a um tubo cilíndrico rígido, liso e seco de acrílico, com um comprimento de 30cm e um diâmetro interno de 4mm. Esta conexão foi feita com um tubo de látex semi-rígido. Uma quantidade específica do muco foi colocada na extremidade distal do tubo de acrílico enquanto a válvula solenóide permanecia fechada. O temporizador acionou a abertura da válvula solenóide pelo tempo determinado e permitiu a saída de um fluxo de oxigênio, provocando o deslocamento da amostra. A distância percorrida pela amostra testada foi medida em milímetros (GASTALDI, 1997).

6.3 ÂNGULO DE ADESÃO

Outra forma de avaliação do muco é a análise da adesividade descrita pela força de adesão entre o muco e uma superfície sólida e a medida do seu ângulo de contato, são reflexo da tensão superficial do muco. A propriedade física que demonstra o comportamento de um líquido sobre uma superfície plana é denominada wettability, e esta é caracterizada pelo ângulo de adesão ou ângulo de contato (HOUTMEYERS *et al.*, 1990; MACCHIONE *et al.*, 1995).

Alguns métodos são utilizados para a leitura do ângulo da adesão. Há uma descrição da leitura do ângulo de contato através da visualização de uma gota de líquido sobre uma lâmina, através de uma ocular de um goniômetro. O sistema é inclinado e o ângulo é medido quando a gota está em movimento lento (GRAY, 1965).

6.4 MICRORREÔMETRO MAGNÉTICO

Segundo King (1988), o microrreômetro magnético é idealmente usado para o estudo de propriedades viscoelásticas do muco normal do trato respiratório. Ele trabalha melhor com amostras que são moderadamente claras e com uma viscoelasticidade intermediária. No entanto, com certa adaptação, ele pode ser usado para análise de escarro com ampla variabilidade de propriedades reológicas e grande opacidade.

A técnica do microrreômetro magnético, originalmente desenvolvida por Litt e adaptada por King & Macklem em 1977, permitem a mensuração da viscoelasticidade dinâmica com a utilização de microlitros de muco. Esta técnica é realizada a partir do estudo da relação temporal entre a força e deslocamento de uma pequena bola de aço submetida à ação de um campo magnético, que é oscilado de uma forma sinusoidal (KING, 1988; MACCHIONE *et al.*, 1995; SILVEIRA *et al.*, 1992).

A sombra da bola de aço é projetada através de um microscópio sobre um par de fotocélulas, que permite determinar o deslocamento da esfera mediante a força sobre ela aplicada. Deste modo, a esfera de aço inserida dentro da amostra de muco funciona como um “probe” reológico. A força que movimenta essa esfera de aço é aplicada com diferentes frequências que podem variar de 1 a 100 radianos por segundo. A utilização de baixas frequências permite a simulação da transportabilidade do muco pelo batimento ciliar, sendo que a simulação da transportabilidade pela tosse é obtida com altas frequências (LORENZI *et al.*, 1992; SILVEIRA *et al.*, 1992).

7 FOTOACÚSTICA

Desde a sua descoberta por Bell, em 1881, o efeito fotoacústico, similarmente conhecido como técnica fotoacústica, tem sido usado de maneira crescente na pesquisa de diversos materiais, não apenas os materiais sólidos, como era feito assim que foi descoberto, mas também de outros materiais que compõem alguns sistemas biológicos (LOPEZ *et al.*, 1999; ROSENCWAIG, 1980).

Para a caracterização de algum material, uma ampla variedade de propriedades físicas podem ser consideradas, incluindo as propriedades térmicas. As técnicas fototérmicas têm sido úteis para a caracterização de vários materiais, tal como cristais, líquidos, gases e também materiais biológicos (JUÁREZ *et al.*, 2002).

Considerando as propriedades térmicas, a técnica fotoacústica tem sido empregada na caracterização de várias amostras pela mensuração de sua difusividade e efusividade térmicas. A efusividade (ϵ) é considerada como uma importante propriedade termofísica em estudos que envolvem processos de aquecimento e esfriamento de uma amostra. Ela mede essencialmente a impedância da amostra, ou seja, a habilidade da amostra em trocar calor com o ambiente (LOPEZ *et al.*, 1995; SANCHEZ *et al.* 1999).

$$\epsilon = (k\rho c)^{1/2} \quad [1]$$

A equação acima define a efusividade térmica onde k , ρ e c são respectivamente condutividade térmica, densidade e calor específico:

A técnica fotoacústica é um tipo de técnica fototérmica que se baseia na absorção de luz modulada por uma amostra dentro de uma câmara (célula) fechada contendo ar em contato com a amostra e na conversão desta energia luminosa em calor, gerando ondas térmicas que se propagam pelo meio. Para isso, a luz incidente passa por um modulador (*chopper*) que envia um sinal de referência a um outro amplificador síncrono (*lock-in*).

Quando a luz atinge a amostra, ocorre um fluxo de calor periódico produzindo mudanças de pressão da amostra para a camada de ar da célula, provocando na mesma uma

variação de temperatura com frequência igual à da modulação da luz incidente (NERY et al., 1987).

Ainda segundo Nery et al (1987), apenas uma camada fina de gás, na vizinhança da amostra, responde termicamente às flutuações de temperatura da mesma. Esta camada sofre um processo cíclico de contração e expansão, funcionando como um pistão vibratório sobre o resto da coluna de gás. Estas oscilações de pressão geram sinais sonoros que são captados por um microfone no interior da célula.

Rosencwaig (1980) descreve que embora existam alguns materiais biológicos que sejam naturalmente solúveis, muitos outros são limitados por membranas, são parte de células ou são estruturas de tecidos que se apresentam de forma insolúvel. Estes materiais possuem biologicamente função semelhante à de uma matriz sólida, o que dificulta a obtenção de dados ópticos por meio de técnicas convencionais uma vez que solubilizados são significativamente alterados. A espectroscopia fotoacústica possibilita a obtenção de dados ópticos neste tecidos biológicos intactos e também em amostras opticamente opacas, constituindo assim um importante instrumento de pesquisa e diagnóstico na biologia e na medicina.

7.1 CELULA FOTOACÚSTICA COM DUAS FACES

A configuração experimental empregada neste trabalho foi aquela de iluminação frontal (dianteira), na qual o sinal fotoacústico medido é gerado do mesmo lado da face iluminada do material absorvedor. A figura 2 mostra o desenho de uma típica célula fotoacústica com duas faces na configuração de incidência dianteira, onde se observa que o líquido encontra-se acima da câmara fotoacústica e o feixe de luz atravessa primeiro a camada de gás dentro da câmara até alcançar o alumínio, desta forma a luz não incide diretamente no material estudado. Nesta câmara é gerada a onda acústica, a qual é transmitida por um canal de ar até o microfone, e este gera uma tensão que é detectada apropriadamente. Esta célula deve permanecer fechada para manter estável o sinal acústico dentro da câmara (ROSENCWAIG, 1976).

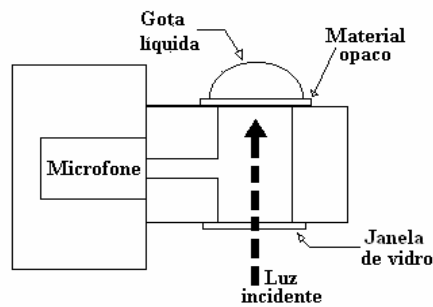


Figura 2. Corte transversal de uma célula fotoacústica com duas faces. A luz modulada incide sob a câmara fotoacústica. Um disco de vidro fecha, inferiormente, a câmara. A amostra (gota líquida) encontra-se acima da câmara, sobre o material opaco (folha de alumínio). A câmara fotoacústica contém ar, o qual transmite a onda de pressão até o microfone.

A folha de alumínio (espessura = $25\mu\text{m}$), conforme mostrada na figura 2, serve tanto como suporte da amostra, quanto para absorver a luz incidente, proveniente de uma fonte modulada em uma determinada frequência, e que atravessa a janela de vidro. A câmara fotoacústica é hermeticamente fechada na atmosfera ambiente, de forma que contém ar em seu interior, na mesma pressão do ambiente do laboratório. A figura 3 abaixo apresenta varias faces da célula fotoacústica, podendo ser observada a folha de alumínio e o anel de PVC que receberá a mostra.



(a)



(b)



(c)

Figura 3. Célula fotoacústica com duas faces. (a) Vista lateral. (b) Vista superior sem a amostra. (c) Vista lateral com a folha de alumínio vedando superiormente a célula e um disco de PVC (como porta-amostras) acima, ambos colados com graxa de silicone.

A situação esquematizada na figura 4 mostra o calor gerado na superfície pela absorção de luz se difundindo para os meios adjacentes proporcionais às suas efusividades térmicas, que representam a habilidade do material absorvedor em trocar calor com o meio.

Nesse esquema, o fluxo de radiação Φ_0 (energia luminosa que se transforma em calor na superfície) é igual a soma do fluxo sobre a amostra (Φ_{am}) com o fluxo de calor para o lado do ar (Φ_{ar}).

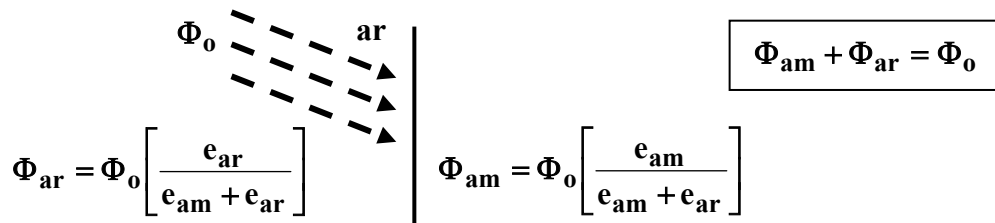


Figura 4: Participação do calor gerado devido à absorção de radiação, Φ_0 , entre o amostra, Φ_{am} , e o ar, Φ_{ar} .

De acordo com Rosencwaig e Gersho (1976), para o caso deste trabalho o sinal fotoacústico é descrito pela expressão :

$$S = S_0 \left[\frac{\mu_{ar} \mu_{am}}{k_{am}} \right] = S_0 \left[\frac{\sqrt{\alpha_{ar}}}{\pi f} \right] \times \left[\frac{\sqrt{\alpha_{am}}}{k_{am}} \right] = S_0 \left[\frac{\sqrt{\alpha_{ar}}}{\pi f} \right] \times \left[\sqrt{\frac{\rho_{am} c_{am}}{k_{am}}} \right] \quad [2]$$

Na qual:

S_0 = constante de amplitude que depende essencialmente da temperatura ambiente, da pressão ambiente, da intensidade de luz incidente, da geometria da câmara fotoacústica e da sensibilidade do microfone. Parâmetros estes que permanecem constantes durante as medidas.

μ = comprimento de difusão térmica do meio: amostra (μ_{am}) ou ar (μ_{ar}).

Em algumas situações, o calor modulado produzido nos absorvedores precisa atravessá-los e chegar até sua superfície antes de gerar as ondas sonoras. Como a amplitude

do sinal diminui exponencialmente com a distância, só a parcela de radiação absorvida a uma distância de até um comprimento de difusão térmica (μ) da superfície será responsável pela componente térmica do sinal fotoacústico. Este fato está relacionado com a espessura do material.

Para classificar o regime térmico do material absorvedor, cabe ressaltar que o parâmetro μ depende do material e, dessa maneira, se a espessura da amostra é muito menor que μ , então ela é considerada termicamente fina, ou seja, a temperatura é praticamente a mesma em toda a sua extensão. Por outro lado, quando a espessura da amostra é muito maior que μ , ela é considerada termicamente grossa, ou seja, após a incidência de um pulso de luz que se transforma em calor, em sua superfície anterior, a temperatura decai ao longo da amostra até sua superfície posterior. O comprimento de difusão térmica é dado por:

$$\mu = (\alpha / \pi f)^{1/2} \quad [3]$$

onde α é a difusividade térmica da amostra e f é a frequência de modulação da luz, de forma que μ depende da frequência de modulação da luz.

Por sua vez, a difusividade térmica é definida por:

$$\alpha = k/\rho c \quad [4]$$

onde k é a condutividade térmica da amostra, ρ é a densidade e c é o calor específico da amostra ou do ar.

8 OBJETIVOS

- Monitorar pela técnica fotoacústica a interação de drogas mucoativas no muco de portadores de Fibrose Cística.

- Mensurar o tempo de interação do muco brônquico de fibrocísticos em solução salina hipertônica a 3% , 6% e N-acetilcisteína através da técnica fotoacústica.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para análise fotoacústica da interação de drogas mucoativas com muco brônquico de portadores de fibrose cística foram estudados os mucos de 10 doadores portadores de fibrose cística, classificada de F508, forma mais grave do quadro pulmonar, colonizados por *pseudomonas aeruginosas* encontrada em culturas de escarros prévias ao estudo, em acompanhamento no setor de fisioterapia cardiorespiratória do Centro Universitário de Vila Velha, e Unidades Básicas de Saúde da cidade de Vila Velha. O protocolo de coleta foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) e, após serem comunicados juntamente com os pais sobre os procedimentos da pesquisa, todos os responsáveis pelos pacientes participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Todas as coletas foram feitas no período da tarde, entre as 13 e 16 horas. Os pacientes foram orientados a não fazer uso de nenhum tipo de mucolítico nos dias de coleta. Foram descartados os mucos com presença de sangue (hemoptise) e com grande quantidade de saliva. Para um total de 15 amostras onde, um doador pode fornecer mais de uma amostra com intervalo de duas semanas entre uma coleta e outra. Foram doadores sete sujeitos do sexo masculino e três do sexo feminino com idade média de 15 ± 2 anos. Do total de participantes, três faziam uso periódico de solução salina hipertônica 5,5% e os outros sete utilizavam rh-DNase. As amostras do muco brônquico selecionadas tinham um volume maior que 3 mL e aspecto mucóide purulenta.

Todas as amostras de muco foram coletadas pedindo-se para o paciente e o voluntário tossir voluntariamente, sem auxílio, e para expectorar sobre um coletor universal de escarro previamente tampado com gaze fixada externamente com esparadrapo. Esse protocolo foi seguido para que o excesso de saliva fosse absorvido pela gaze segundo o protocolo proposto por Bossi (1988).

Bossi (1988) também descreveu um outro protocolo de coleta semelhante ao utilizado neste trabalho, porém o excesso de saliva foi absorvido por chumaços de algodão colocados lateralmente dentro da boca. Assim como Bossi (1988), Jansen & Lutter (2001) descrevem que a saliva pode contaminar o muco brônquico e por isso alterar as propriedades reológicas do mesmo. Optamos por não separar o excesso de saliva após o muco ter sido expectorado por acreditar que o chumaço de algodão colocado dentro da boca e, perto dos orifícios das glândulas salivares, pudesse estimular a salivação e não reter o excesso de saliva.

Após o procedimento de coleta, o muco foi retirado da gaze com uma pinça e armazenado em *ependorf's* previamente preenchidos com óleo de vaselina (Rioquímica®-Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA.) para que não houvesse a desidratação do mesmo.

Como já dito, as coletas sempre foram realizadas no início do período vespertino sendo que todas as amostras foram estocadas à temperatura de -20°C com período máximo de duas horas entre a coleta e o congelamento. Todos os *ependorf's* foram previamente numerados para posterior identificação das amostras.

Em relação à temperatura de armazenamento do muco brônquico humano, não encontramos padronização de um valor exato estabelecido para o seu congelamento. Os estudos de Majima et al. (1999, 2000), sobre o muco nasal de pacientes com sinusite crônica, utilizaram para o congelamento das amostras as temperaturas de -80°C e -70°C respectivamente.

Quando Lorenzi-Filho et al. (1992) armazenaram amostras de muco de ratos Wistar para correlacionar os efeitos de suas propriedades reológicas com o transporte ciliar, as amostras foram estocadas em uma temperatura de -20°C e imersas em *ependorf's* preenchidos com óleo de vaselina para que não fossem desidratadas.

O efeito da temperatura de congelamento foi estudado em muco de rã por Gastaldi, Jardim e King em 2000. Para isto, o muco de dez rãs foi congelado a -20°C e -80°C , durante 90 dias, sem sofrer alterações no ângulo de adesão, no transporte no palato de rã e na máquina de tosse, em nenhuma das temperaturas estudadas. Baseado neste estudo, armazenamos nossas amostras de muco brônquico humano à temperatura de -20°C por saber que este

parâmetro pode variar de -20°C a -80°C e mesmo assim não alterar as propriedades reológicas do muco brônquico.

Logo após a expectoração e, antes que as amostras fossem colocadas dentro dos *eppendorf's*, as mesmas foram classificadas macroscopicamente pelo seu grau de espinabilidade: menor espinabilidade (+) e maior espinabilidade (++).

Para tal procedimento, após as amostras de muco brônquico serem expectoradas sobre a gaze colocada no coletor universal, as mesmas foram retiradas da gaze pela pinça e colocadas entre as pontas dos dedos indicador e polegar do examinador. Posteriormente, as pontas dos dedos foram afastadas a uma distância de 2 cm e o comportamento de alongamento/estiramento das amostras foi subjetivamente descrito como espinabilidade.

Quando a amostra de muco brônquico era estirada/alongada pelas pontas dos dedos e não perdia sua continuidade, ou seja, não se “partia” dentro do espaço de 2 cm, a mesma era classificada em relação ao seu grau de espinabilidade macroscópica com o sinal (++). As amostras que perderam sua continuidade quando as pontas dos dedos foram separadas em uma distância similar a anterior; foram classificadas com o sinal (+) em relação ao seu grau de espinabilidade macroscópica.

Depois que as amostras de muco brônquico foram colocadas entre as pontas dos dedos, o movimento de afastamento dos mesmos foi realizado três vezes com cada amostra.

Para realização deste procedimento, o examinador calçou luva estéril. Logo após o término do mesmo, as amostras foram retiradas com a pinça sobre a ponta de um dos dedos e então colocadas dentro dos *eppendorf's* preenchidos com óleo de vaselina e previamente numerados.

A classificação do aspecto das amostras foi realizada segundo descrições de Tarantino (1997), Palombini e Miorin (2001) que descrevem que o aspecto do escarro varia de acordo com seus constituintes. Para eles o termo mucóide é usado quando o escarro se apresenta com muita água, eletrólitos, mucoproteínas e baixa celularidade. Já o escarro purulento contém todos os constituintes anteriores, piócitos em grande quantidade e alta celularidade. Na prática clínica este último aspecto indica infecção bacteriana.

Todas as coletas, assim como as classificações das amostras, foram realizadas pela mesma examinadora para garantir maior fidedignidade.

9.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As análises experimentais foram realizadas no Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

9.2.1 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Os portadores de Fibrose Cística participantes doaram um total de quinze amostras de muco, com volume maior que 3 mL, aspecto muco purulento, que foram congeladas, e escolhidas para o experimento de forma aleatória, para que sua prévia identificação não interferisse no resultado final encontrado.

No início do experimento, após serem descongeladas, as amostras de muco foram submersas rapidamente em Xilol, que se caracteriza como um solvente à base de hidrocarbonetos, comumente utilizado na confecção de laminas histológicas, para que fosse retirado o óleo de vaselina. Posteriormente, a amostra de muco foi dividida em três partes iguais, para análise separada da interação com cada mucolítico escolhido. Cada parte do muco foi classificada em um grupo de estudo; o grupo 1 utilizou a solução salina hipertônica a 3%, o grupo 2 utilizou solução salina hipertônica a 6% e o grupo 3 utilizou a N-acetilcisteína, totalizando quarenta e cinco corpos de prova para análise.

Posteriormente, cada parte da amostra com volume de 0,1 mL foi colocada sobre um suporte em forma de arruela, com cerca de 8 mm de diâmetro e com uma borda esquematizada com uma arruela de policloreto de vinila (anel de PVC, diâmetro externo de 16mm e diâmetro interno de 8mm) sobre a folha de alumínio com 25 μ m de espessura para a vedação da célula, que foi acoplado à montagem fotoacústica. Para fixar a folha de alumínio e o anel de PVC sobre a célula foi utilizado graxa de silicone. A luz passa pela janela de vidro, atravessa a câmara fechada e incide na folha de alumínio que por sua vez esta em contato com

o muco, que entrará em contato com a substância mucolítica, como demonstrado na figura 5 abaixo.

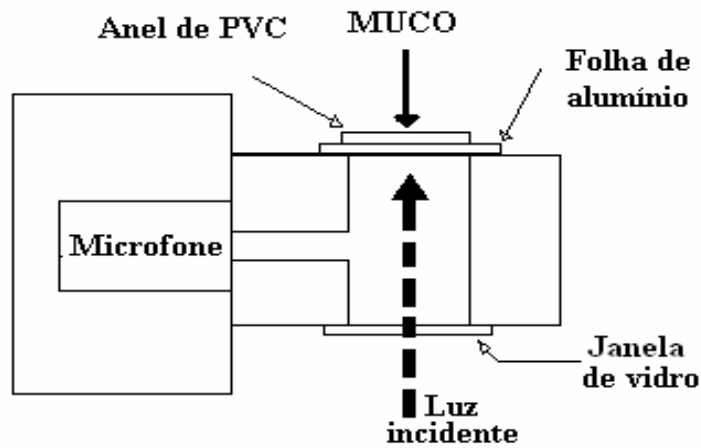


Figura 5. Corte transversal de uma célula fotoacústica com duas faces. A luz modulada incide sob a câmara fotoacústica. Um disco de vidro fecha, inferiormente, a câmara. A amostra (muco) fica sobre o papel alumínio e dentro do anel de PVC.

9.2.2 MONTAGEM FOTOACÚSTICA

O esquema experimental empregado neste trabalho para a detecção do sinal fotoacústico usou como fonte de luz uma lâmpada halógena de tungstênio (Xelux, 24V - 250W). A luz da lâmpada foi modulada mecanicamente com um modulador mecânico ou chopper (SRS, mod. SR540 - USA). A frequência de modulação utilizada foi 17 Hz.

Lentes e espelhos foram usados para levar a luz até a câmara fotoacústica, onde um microfone de eletreto detectava o som gerado na câmara. O modulador mecânico e a saída do microfone foram conectados a um amplificador síncrono (lock-in) (SRS, mod. SR530 - USA), o qual permitiu que fossem medidas a amplitude e a fase do sinal fotoacústico. Por sua vez, o amplificador lock-in estava em comunicação com um computador para que fossem armazenados os dados colhidos.

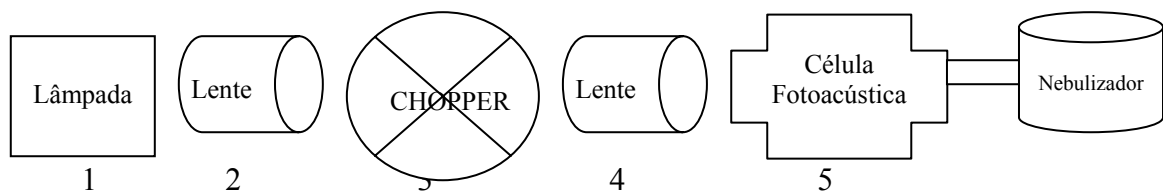


Figura 6. Diagrama de blocos do arranjo experimental utilizado com a célula fotoacústica de duas faces.

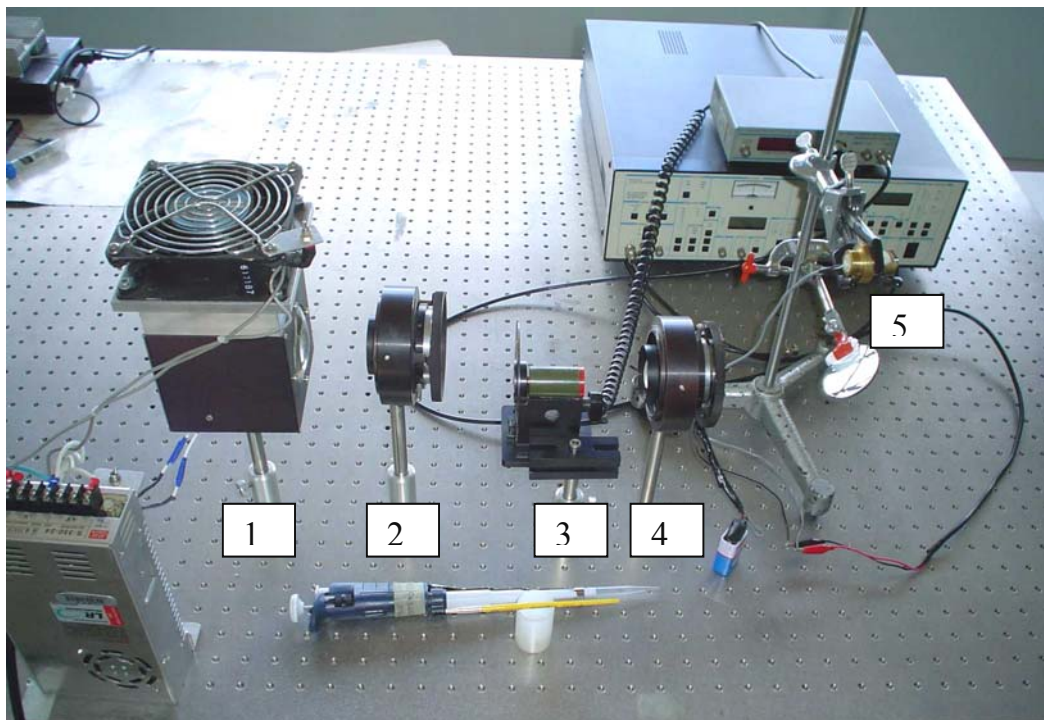


Figura 7. Arranjo experimental utilizando a célula fotoacústica com duas faces.

A figura 6 apresenta em forma de diagrama o modelo experimental da figura 7, e podem ser relacionadas através da numeração, por sua vez a figura 6 mostra a seqüência montada para geração do sinal fotoacústico.

O volume da amostra foi de cerca de 0,1mL em cada medida e o sinal fotoacústico, foi monitorado usando o programa Sin530r desenvolvido no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) que foi

ajustado para registrar 50 pontos a cada 5 minutos, com um total de 15 registros durante 1h10, o que corresponde ao tempo total de cada medida fotoacústica efetuada com cada muco. A escala de sinal adequada para as mensurações foi de 0.005 volts e a frequência utilizada foi de 17 Hz.

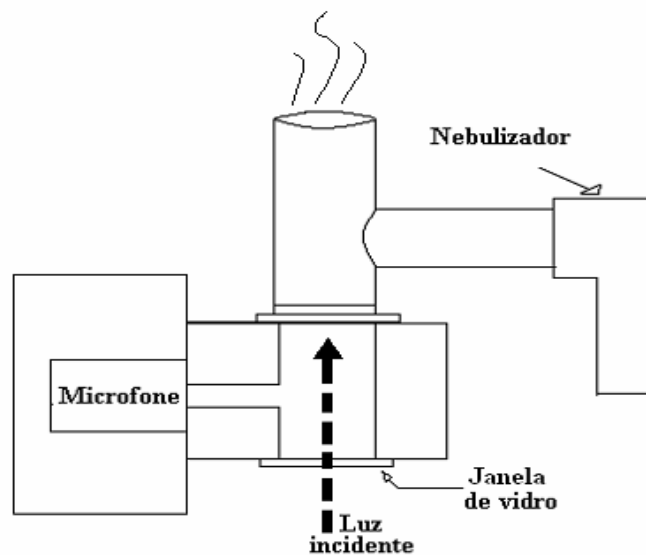


Figura 8. Conjunto de célula fotoacústica com nebulizador acoplado com dispositivo em forma de T, que leva a névoa de mucolítico até o muco, imitando o trajeto feito na via aérea.

Como mostrado na figura 8, para colocar o muco em contato com o mucolítico foi utilizado um nebulizador ultrassônico da marca NS equipamentos, com frequência ultrassônica de 1,6MHz, e partículas entre 0,5 e 10 microns, acoplado à célula fotoacústica por um tubo em forma de T.

O primeiro registro de 50 pontos é feito com o muco dentro do anel de PVC sobre o alumínio, após este registro é ligado o nebulizador por cinco minutos, desligado e feito o segundo registro, este procedimento se repete na terceira e quarta medida, totalizando quinze minutos de nebulização, encerrado o período de nebulização continuamos registrando 50 pontos a cada cinco minutos até que se completem quinze registros que vão totalizar uma hora e dez minutos da medida, este esquema da captação de pontos e seus intervalos demonstrado na figura 9 da pagina 47. Os dados foram arquivados em arquivos com formato de texto (txt) e depois foram analisados no software Microcal™ Origin® 6.0

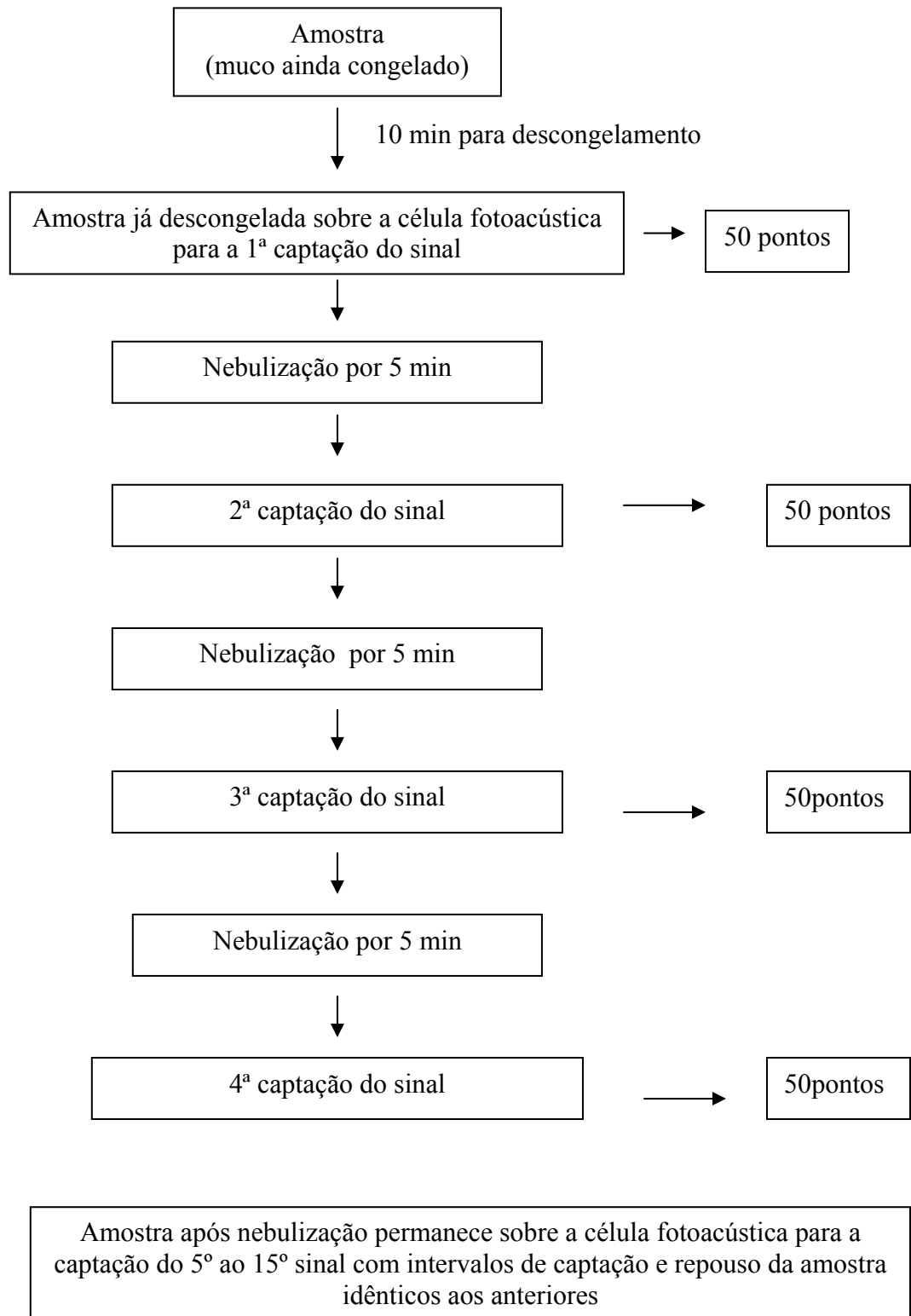


Figura 9: Esquema representativo do protocolo experimental.

Os dados foram arquivados em arquivos com formato de texto (txt) e depois foram analisados no software Microcal™ Origin® 6.0.

A evolução do processo de solubilização em função do tempo pode depender de vários fatores, como a composição química e a quantidade de muco, o processo empregado para a solubilização e o tipo de agente ou fármaco mucolítico que é utilizado neste processo. Nas várias fases da solubilização, as características físicas e químicas do muco brônquico apresentaram alterações. Dentre as características físicas, podemos apontar as propriedades reológicas e térmicas. Medidas dessas propriedades permitem acompanhar a evolução da solubilização.

O processo de solubilização pode ter seu comportamento descrito por:

$$\frac{dF}{dt} = \left(\frac{1}{\tau}\right) \times F^m \times (C - F)^n \quad [5]$$

onde, em uma reação química simples, F pode representar a fração de ligações químicas completadas, C o número máximo de ligações químicas que podem ser completadas e τ é o tempo característico da reação.

Considerando m e n igual a 1, temos :

$$\frac{dF}{dt} = \left(\frac{1}{\tau}\right) \times F \times (C - F) \quad [6]$$

Essa expressão, conhecida como equação de Volterra-Lotka, diz que a taxa de reação é proporcional à fração de ligações já completadas multiplicada pela fração que falta para completar. A solução dessa equação leva à seguinte expressão para F :

$$F = C \frac{\exp [(t - t_0) / \Delta t]}{1 + \exp [(t - t_0) / \Delta t]} \quad [7]$$

F descreve uma função tipo crescimento – saturação, conforme representada na figura 10, denominada função logística.

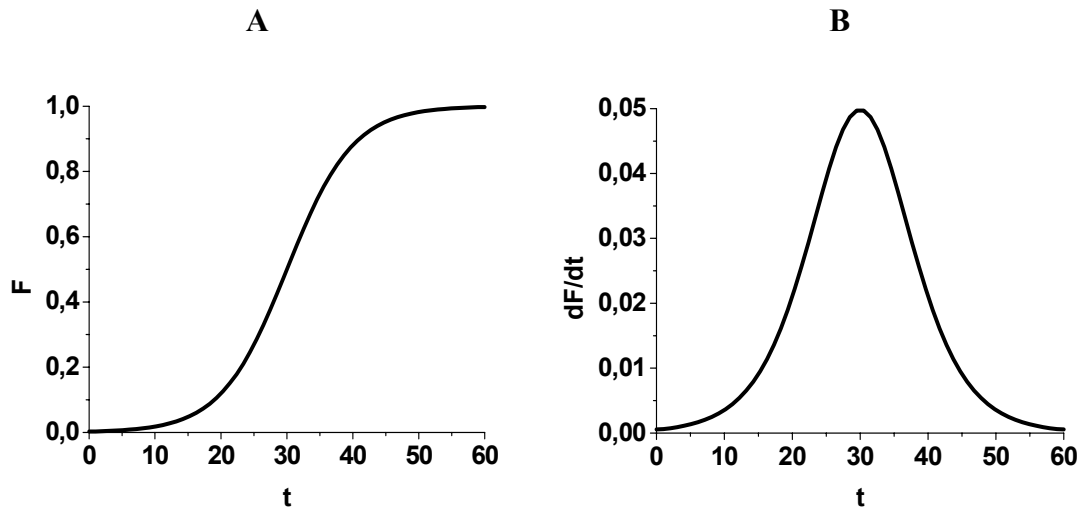


Figura 10:- Função Logística (A) e sua derivada (B).

Monitoramos o sinal fotoacústico em função do tempo, construindo um gráfico das médias dos registros feitos durante a medida. Como podemos observar na figura 11, o ponto zero no eixo X descreve a media do primeiro registro do sinal fotoacústico captado do muco ainda sem contato com qualquer mucolítico, nos pontos 5, 10 e 15 minutos o muco está recebendo o mucolítico através da nebulização, e nos momentos seguintes estão demonstrados na figura 11, onde se observa o processo de saturação muco-mucolítico. Para análise e comparação entre os grupos, vamos nos concentrar na fase de aceleração da curva e no ponto que inflexão de determina onde os processos químicos se estabilizam.

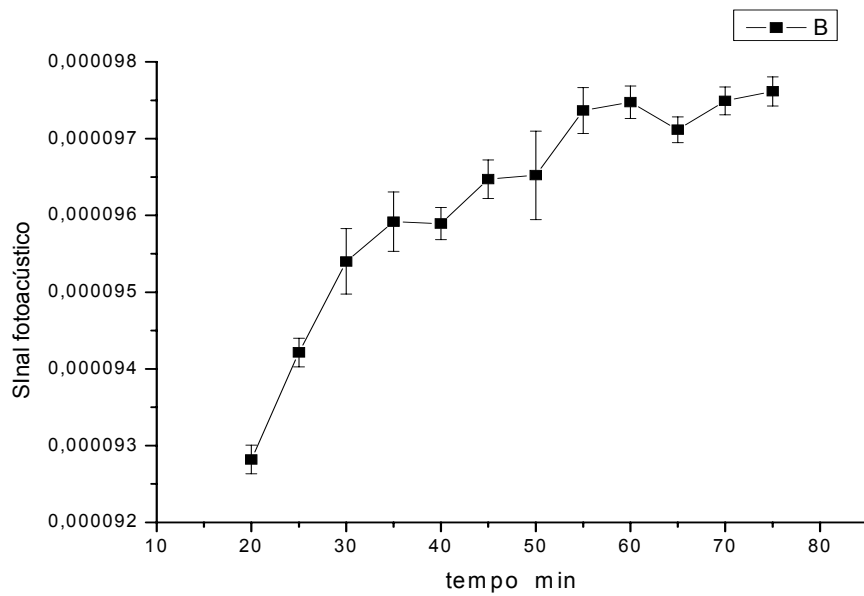


Figura 11: Sinal fotoacústico em função do tempo.

Como observado na figura 10 na imagem B, o presente estudo analisa os parâmetros referentes ao momento de pico da velocidade de interação do mucolítico com muco brônquico humano de portadores de Fibrose Cística em solução salina hipertônica a 3%, 6% e com N-acetilcisteína, que podemos reconhecer como ponto de inflexão ou ponto saturação máxima do processo de interação, e o tempo do processo de interação deste mesmo muco com mucolítico, que observamos na fase ascendente da curva logística de crescimento ou rampa de aceleração.

9.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Denominou-se os parâmetros a serem analisados de t_0 para o momento de pico da interação muco mucolítico e, Δt para o tempo total de interação. Dividiu-se as amostras em três grupos: **Grupo 1-** que utilizou solução salina hipertônica a 3%, **Grupo 2** - que foi testado com solução salina hipertônica a 6% e **Grupo 3-** que utilizou N-acetilcisteína conhecida comercialmente como Fluimucil.

Para cada grupo de medidas foram mensurados os parâmetros referentes ao momento de pico da velocidade de interação (t_0) e tempo do processo de interação (Δt). Para sabermos se os parâmetros eram significativamente diferentes, foi aplicado o teste t de *Student* não pareado nos valores entre os três grupos, com nível de significância de 5%. Para isto foi usada a ferramenta de análise estatística do programa de análise estatística InStat®.

Foi utilizado um teste paramétrico, pois as variâncias foram significativamente iguais (teste de homogeneidade) e os dados foram distribuídos em uma distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov). Estes testes foram feitos no programa de análise estatística InStat®.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

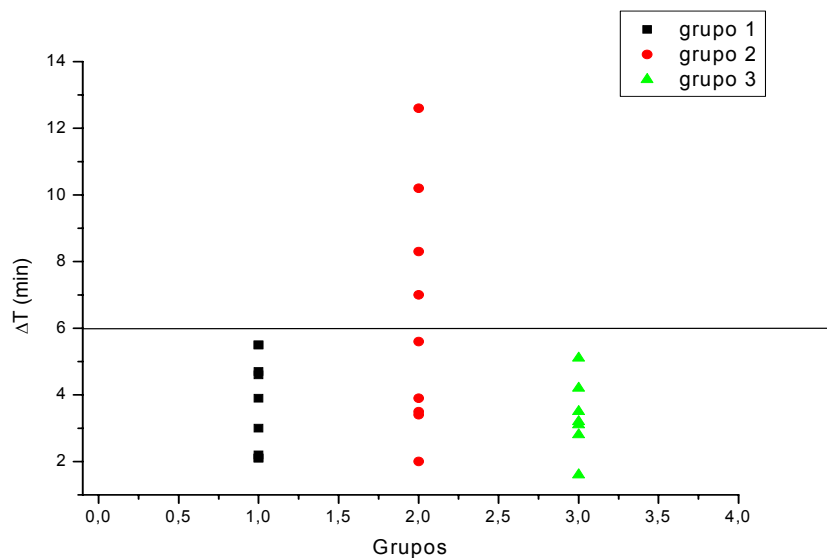
O muco, ou epifase gel da secreção respiratória, tem como ponto de destaque o fato de ser uma substância viscoelástica, ou seja, que possui propriedades tanto de líquidos quanto de sólidos, permitindo varias formas de estudo dentro da Física. A reologia é amplamente descrita na literatura nos métodos de estudo de muco brônquico, por analisar propriedades e comportamentos de corpos deformáveis que não são puramente sólidos ou líquidos. A Fotoacústica é bem descrita em estudos de efusividade e difusividade térmica em materiais líquidos e sólidos, sendo um grande desafio o estudo das propriedades em material viscoelástico (BALDERAS-LOPEZ, 1995; DELGADO-VASALO, 1999; GUTIÉRREZ-JUAREZ, 2002).

O principal achado a ser destacado no resultado do estudo é o comportamento não homogêneo das amostras submetidas à solução salina 6%, o grupo 2 do estudo. Este grupo teve maior dispersão dos dados tanto no tempo total (Δt), quanto no momento de pico da interação (t_0). Na tabela 1 abaixo estão descritos todos os valores médios de Δt , onde observa se alguns tempos de interação maiores no grupo dois, porém a diferença entre as médias dos três grupos não foi significativa para um $p < 0,05$, como descrito na tabela 2 e demonstrado na figura 12.

Tabela 1: Valores de Δt (min) expressos em ajuste \pm erro padrão dos Grupos 1, 2 e 3.

Amostras	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
01	$4,6 \pm 3,7$	$8,3 \pm 0,9$	$3,1 \pm 1,0$
02	$5,5 \pm 1,3$	$10,2 \pm 2,3$	$3,5 \pm 1,3$
03	$2,1 \pm 1,1$	$7,0 \pm 2,4$	$3,2 \pm 2,2$
04	$5,5 \pm 4,3$	$12,6 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,5$
05	$2,2 \pm 0,9$	$5,6 \pm 3,4$	$5,1 \pm 1,8$
06	$2,1 \pm 0,9$	$2,0 \pm 1,4$	$1,6 \pm 1,3$
07	$4,7 \pm 1,4$	$3,5 \pm 1,9$	$4,2 \pm 2,0$
08	$3,0 \pm 1,1$	$3,9 \pm 2,9$	
09	$3,9 \pm 1,2$	$3,4 \pm 0,4$	

Na análise de dispersão dos valores, os dados demonstram significativa dispersão nos valores de Δt e t_0 do grupo 2, que utilizou SSH 6%. Esta dispersão fica clara na figura 12, onde foram distribuídos os valores de Δt . Os valores dos grupos 1 e 3 se concentram entre dois e seis minutos de interação, enquanto que o grupo dois chega a ultrapassar doze minutos de interação.

**Figura 12:** Dispersão dos valores de Δt

A diferença da média do Δt entre os grupos não foi significativa para um $p < 0,05$ nas amostras analisadas, porém podemos observar uma tendência a diferença no grupo 2 na figura 13, a justificativa para não confirmação deste fato poderia ser o numero pequeno de amostras analisadas. Na tabela 2 abaixo estão descritas as médias de Δt de cada grupo e o número de amostras analisadas.

Tabela 2: Valores médios de Δt expressos sob ajuste \pm erro padrão.

	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>
n	9	9	7
Δt (min)	$3,7 \pm 1,4$	$6,3 \pm 3,5$	$3,4 \pm 1,1$

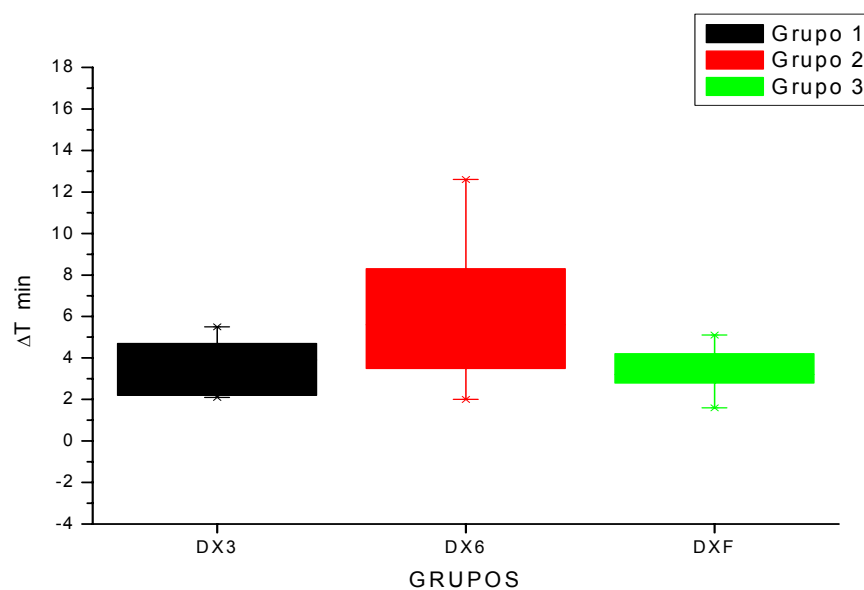


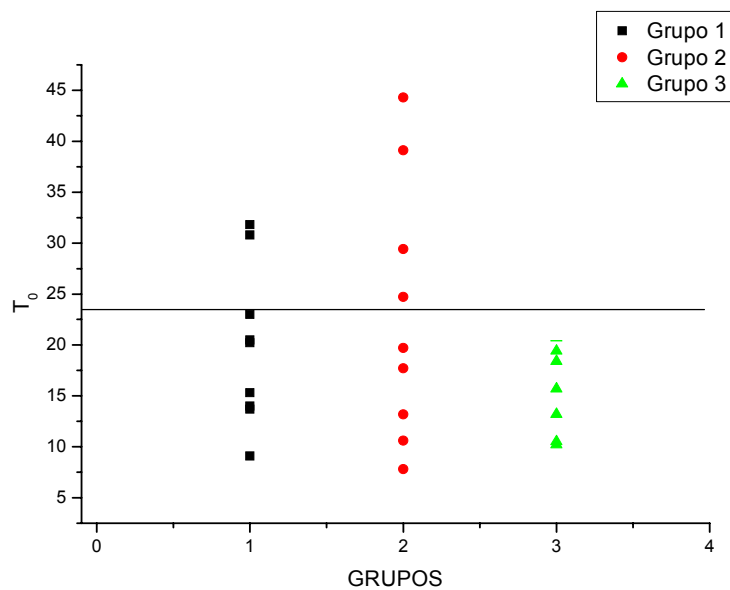
Figura 13: Distribuição dos valores médios do Δt .

O momento chamado t_0 que representa o pico de interação entre muco e substancia mucolítica, que é extraído do ponto de inflexão da curva de sinal fotoacústico em função do tempo, representa o momento de esgotamento das reações físico-químicas que ocorrem durante o processo mucolítico. Na tabela 3 estão descritos todos os valores de t_0 analisados.

Tabela 3: Valores de t_0 (min) dos Grupos 1, 2 e 3 expressos sob ajuste \pm erro padrão

Amostras	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
01	15,3 \pm 5,4	39,1 \pm 1,4	15,7 \pm 1,1
02	37,8 \pm 1,4	13,2 \pm 4,0	13,2 \pm 1,5
03	31,8 \pm 1,3	24,7 \pm 6,9	25,5 \pm 5,5
04	20,5 \pm 4,6	44,3 \pm 0,7	10,2 \pm 0,6
05	9,1 \pm 0,8	29,4 \pm 3,6	10,5 \pm 2,4
06	23,0 \pm 1,2	10,6 \pm 1,7	19,4 \pm 1,0
07	20,2 \pm 1,6	7,8 \pm 1,4	18,4 \pm 2,0
08	13,7 \pm 1,1	17,7 \pm 3,0	
09	14,0 \pm 1,1	19,7 \pm 0,5	

No presente estudo, este momento também ocorreu com uma variação de tempo grande, onde se observa na tabela 3 que ele pode ocorrer entre seis e quarenta e cinco minutos, ou seja, o efeito da substancia mucolítica pode se esgotar no inicio da inalação ou perdurar após o seu termino, apresentando se assim com uma variância muito grande, que novamente é mais evidente no grupo 2, como pode ser observado na figura 14.

**Figura 14:** Dispersão dos valores de t_0

Apesar da variação dos valores de t_0 a diferença da média entre os grupos não foi significativa na amostra estudada para um $p < 0,05$, como descrito na tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Valores médios de t_0 expressos sob ajuste \pm erro padrão.

	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>
n	9	9	7
t_0 (min)	$19,8 \pm 7,8$	$22,9 \pm 12,6$	$15,4 \pm 4,2$

Na figura 15 abaixo ocorre um alinhamento entre os grupos por volta de vinte minutos onde concentram-se os valores de t_0 , demonstrando que neste momento ocorre o pico de interação do muco com mucolítico na maior parte das amostras estudadas.

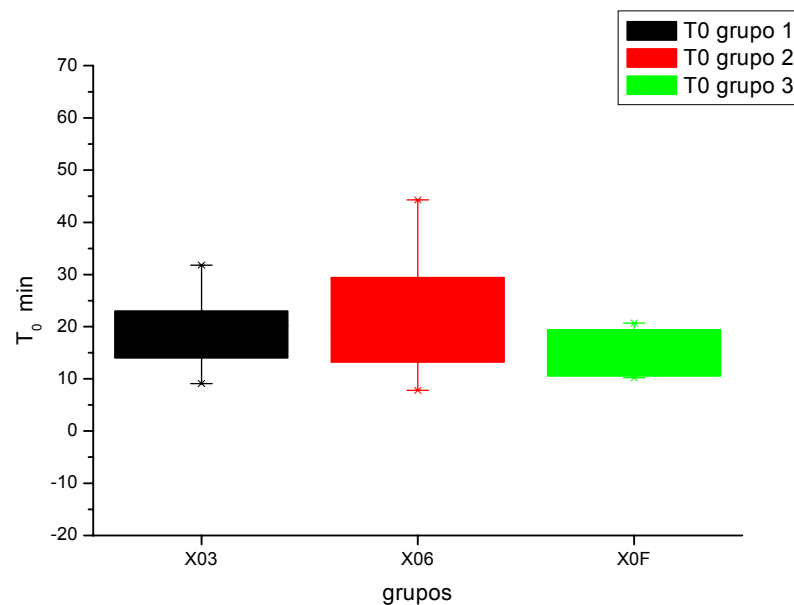


Figura 15: Distribuição dos valores médios de t_0 .

Para uma outra apresentação dos resultados, estão representados na figura 16 todos os valores de Δt e t_0 dos grupos estudados para uma demonstração mais clara da dispersão do grupo 2 em relação aos valores dos outros grupos analisados.

Pode ser visto que também ocorre alguma dispersão no grupo 1 que foi submetido a inalação com SSH 3%, e que o comportamento mais estável foi do grupo que utilizou a N-acetilcisteína, que tem um longo histórico de utilização nos pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica, mas que não é muito descrita como mucolítico para os fibrocísticos. No trabalho de APP (2002) foi utilizado a N-acetilcisteína em portadores de Fibrose cística com bons resultados tanto na *clerance* mucociliar, quanto na função respiratória e recentemente o editorial europeu do Jornal de Fibrose Cística vem sugerindo a pesquisa desta substância nos portadores de FC.

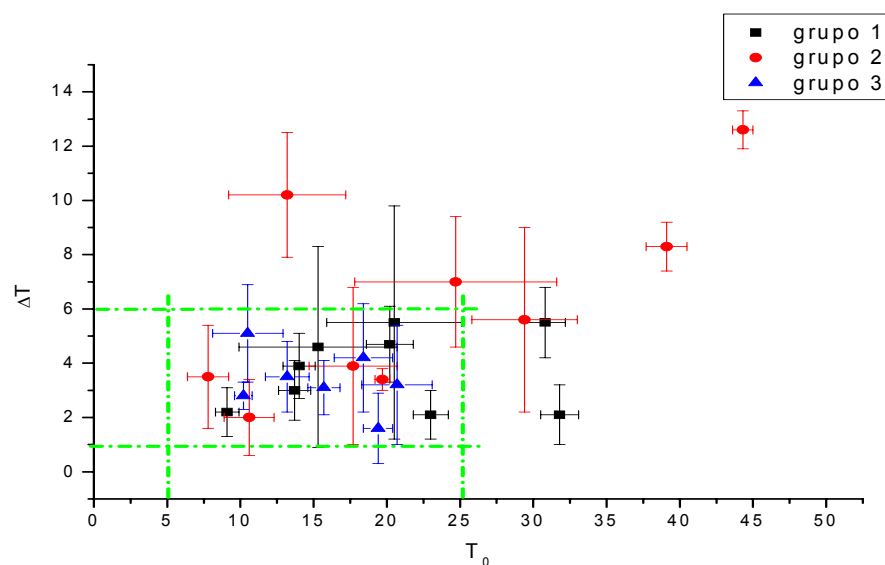


Figura 16: Dispersão dos valores médios de Δt e t_0

Em 1999 ocorreu o primeiro Consenso de Fibrose Cística, que recomendou o uso de soluções salinas em concentrações entre 0,9 e 3% (nível de evidencia 1), com ressalvas sobre alta osmolaridade que poderia causar broncoconstrição reativa e irritação peribucal.

Embora exista esta recomendação, muitos autores relatam em seus estudos concentrações variadas de SSH em pacientes de FC, de 6% (RIEDLER *et al* ;1996), 7% (DONALDSON; 2006, ROBINSON; 1996, , ELKINS; 2006, SURI; 2002), 12% (ROBINSON; 1997), 14,5% (DAVISKAS; 1996).

Podemos ressaltar que a escolha da inaloterapia deva ser feita com cautela, visto que RODWELL(1996) observou através de espirometria que SSH em alta concentração (10%) ocasionou o estreitamento das vias aéreas após inalação.

Outros trabalhos citam a relação do tempo de interação de substância mucolítica, mas não como objetivo direto do estudo. Pizzichini (2002) em seu estudo sobre indução de tosse por meio de inalações de SSH com equipamentos ultra-sônicos observou que o início da tosse se dá entre 30 segundos a oito minutos após o início da inalação, assim, descreveu o início da ação da substância mucolítica, mas não o seu término.

No estudo de Albertini-Yagi *et al*, o tempo de nebulização com SSH 3% variou entre 7 e 21 minutos, onde a nebulização poderia ser interrompida assim que o paciente apresentasse expectoração. Paggiaro (2002) questiona em seu estudo qual seria o tempo adequado de nebulização de SSH, relata que soluções hipertônicas de baixa osmolaridade poderiam ser usadas com segurança entre 15 e 20 minutos, e nebulizações de até trinta minutos também pareceram seguras, mas ressalva que o intervalo entre as nebulizações também é um fator a ser considerado e recomenda um intervalo mínimo de 24 horas entre as nebulizações, para normalizar a reatividade brônquica.

O tempo de interação em minutos do presente estudo vai de encontro com esta literatura(ALBERTINI-YAGI *et al*, 2005; PAGGIARO, 2002) nos grupos que utilizaram SSH 3% e N-acetilcisteína onde encontramos tempos médios de interação de 19,8 ($\pm 7,8$) e 15,4 ($\pm 4,2$) minutos respectivamente, quanto ao início do processo mucolítico a interação iniciou-se aos 3,7 minutos no grupo que utilizou SSH 3%, aos 6,3 no grupo de SSH 6% e aos 3,4 minutos no grupo que utilizou N- acetilcisteína.

Outros autores relatam em suas metodologias o tempo de nebulização de mucolíticos, sem justificativas para escolha deste intervalo, tendo como objetivo maior testar a eficácia da substância diretamente na função pulmonar, através de espirometrias ou analisar a reologia por métodos variados. Um tempo médio de trinta minutos foi utilizado por Robinson (1996), no estudo de Cataldo (2001), foi descrito um tempo médio de inalação entre 15 e 20 minutos.

No estudo piloto randomizado de Ballmann (2002) os pacientes portadores de Fibrose Cística foram acompanhados por um período de três semanas quanto à função pulmonar através de espirometrias, e submetidos separadamente a tratamento com SSH (5,85%) e rhDNase, que é o mucolítico mais utilizado em FC, e descreveu um tempo médio de inalação no grupo de SSH de 42 minutos, para um tempo médio de inalação de 11 minutos no grupo que usou rhDNase, sem explicar porque utilizou tempos diferentes de inalação. Após três semanas de estudo ambos os grupos tiveram aumento significativo na função pulmonar, com incremento maior no grupo que utilizou SSH (5,85%).

Quanto a o tempo de interação e efeito da inalação com SSH, Robinson (1997), foram descreveu efeitos benéficos na reologia do muco decorrentes da diminuição da viscosidade do muco e incremento do clearance mucociliar, entretanto, estes efeitos parecem durar apenas 90 minutos.

No estudo de King *et al* (1997), o muco de portadores de FC foi estudado *in vitro*, quanto a espinabilidade, elasticidade, viscosidade e transportabilidade, onde foram submetidos a uma incubadora ou câmara para receberem nebulização por 30 minutos, o material foi dividido em cinco grupos, um grupo controle que não foi nebulizado ficou em repouso por 30 minutos, um grupo que usou solução isotônica 0,9%, um grupo com SSH 3%, um grupo recebeu rhDNase e o ultimo uma combinação de SSH + rhDNase, e encontrou redução significativa da viscosidade no grupo da SSH e no grupo que usou a combinação SSH + rhDNase, o aumento da transportabilidade também foi encontrada nos mesmos grupos. Quanto ao tempo total de interação (Δt), os achados deste e estudo também demonstraram semelhança entre as substâncias estudadas, não obtendo diferenças estatísticas entre os grupos para um $p < 0,05$; mantendo uma variância maior no grupo 5 como foi encontrado no t_0 .

Algumas semelhanças com a metodologia do presente estudo foram encontradas no trabalho de Ramos (2004), que submeteu 12 pacientes bronquiectásicos a inaloterapia com N-acetilcisteína (10%), SSH 1,5%, solução salina isotônica 0,9% e água destilada, e não encontrou diferenças significativas imediatamente após a nebulização, quanto aos valores espirométricos, quanto à umidificação do muco, ao ângulo de adesão e o deslocamento na máquina de tosse, porém após 60 minutos da inalação, a solução salina hipertônica demonstrou redução significativa na quantidade de muco expectorado, com melhor transportabilidade, e a N-acetilcisteína promoveu aumento significativo na quantidade de muco associado à tendência de pior transportabilidade.

Aspectos importantes sobre os critérios de escolha da terapêutica de substância mucolíticas são descritos no trabalho de Daviskas (1996), relatando que não devemos nos preocupar somente com a concentração da SSH ou de outra substância mucolítica de escolha, e também levar em conta a anatomia das vias aéreas, o volume a ser inalado e o tempo de inalação, como exemplo, uma SSH de alta concentração como 14% pode ser menos maléfica quanto a broncoconstrição que uma SSH com concentração de 4,5%, levando em conta quantidade a ser inalada, se a SSH de 14% for inalada em uma quantidade de 1ml, este material vai se depositar na cavidade nasal e dificilmente conseguira causar alterações no calibre da via aérea (considerando um paciente adulto), já a inalação de uma concentração menor com um volume maior que 3 mL poderá levar a alterações no calibre da via aérea.

O estudo de None (2005) também apresenta pontos importantes sobre a relação do volume de droga a ser inalado, a concentração, a quebra das partículas durante a nebulização, a capacidade do equipamento, se é capaz de gerar macro ou micromoléculas, a anatomia das vias aéreas e as diferenças entre adultos e crianças.

Todos estes aspectos podem interferir na escolha da terapêutica mucolítica inalatória, além da tolerância do paciente ao mucolítico escolhido, visto que alguns medicamentos levam a várias queixas do paciente como náuseas, vômitos e dores de cabeça. Visto que o portador de FC terá que fazer uso prolongado de mucolíticos, temos que levar em conta todos estes aspectos, tolerância, idade, volume de medicamentos, tempo de inalação e equipamento que vai ser utilizado.

O comportamento do grupo 2, com maior variação nos valores estudados, nos despertou alguns questionamento da prática clínica, mesmo sendo *in vitro* e com uma amostra pequena. Observando as figuras 11 e 13 podemos relacionar estas dúvidas com as observações de Daviskas (1996) e None (2005) que relatam que achados contraditórios nos estudos podem estar relacionados não só com a concentração da droga, mas também com o tempo de exposição à substância e o tipo de nebulizador utilizado .

Dentre os dados apresentados nas figuras 11 e 13, podemos observar que o grupo 2 se divide em dois subgrupos, parte dos valores se reúnem com os outros grupos e parte se dispersa. Como já citamos durante a terapia inalatória existem muitas variáveis que fogem do controle do profissional que aplica a técnica, mesmo que a maior parte dos dados se reúna em um intervalo, podemos afirmar que partes deles não se comportarão da mesma forma o que sugere que fora do tempo comum da terapia possa estar ainda ocorrendo alguma interação entre o muco e a SSH 6%.

As condições do epitélio pulmonar, as presenças de colônias de bactéria e processos inflamatórios agudos, também são fatores que influenciam na resposta do mucolítico e escolha do mesmo. Segundo Wills (1997), a ação dos neutrófilos é menor em ambientes com maior salinidade. No estudo de Suri *et al* (2002) foram mensurados vários mediadores inflamatórios durante o uso de SSH 7% e rhDNase, com uso regular de qualquer uma das substâncias não foi observado alteração significativa dos mediadores, porém com o uso em dias alternados de rhDNase, alguns mediadores tiveram alterações significantes.

Podemos ressaltar que a escolha da inaloterapia deva ser feita com cautela, visto que Rochwel (1996) observou, através de espirometria, que SSH em alta concentração (10%) ocasionou o estreitamento das vias aéreas após inalação.

Na revisão da literatura sobre o uso de SSH para indução de escarro, Scheicher *et al* (2003) relata que o uso de SSH por meio de nebulizadores ultra-sônicos, embora este procedimento não-invasivo pareça ser uma forma relativamente segura de se obter secreções

das vias aéreas de portadores de Fibrose Cística, o mesmo ressalva a importância de monitorar o estreitamento da via aérea e o risco de broncoespasmos severos.

As amostras não foram avaliadas quanto à viscosidade e elasticidade, para evitar manipulação excessiva do muco descongelado antes de ser colocado na célula fotoacústica. A tabela 1 mostra a análise macroscópica da espinabilidade antes e após a medida do sinal fotoacústico, onde foi observado que apenas quatro amostras obtiveram grau satisfatório de espinabilidade(++) com alongamento de dois centímetros sem apresentar rompimento. Verificou-se também, que após o contato com substâncias mucolíticas, todas as amostras apresentaram aspecto mais líquido devido à solubilização do processo, mas macroscopicamente o Grupo2 apresentou-se mais solubilizado após a medida.

Tabela 5: Caracterização das amostras antes e após a nebulização.

AMOSTRAS	COR	ASPECTO	ESPINABILIDADE	DIAGNÓSTICO	
A N T E S	11	Esverdeada	Purulento	+	Colonizados
	04	Amarelo- esverdeado	Purulento	++	Colonizados
A P Ó S	11	Esverdeada	Purulento	+	Colonizados
	04	Amarelo- esverdeado	Purulento	+	Colonizados

Em relação a esta propriedade, apenas podemos descrever que, segundo Girord et al. (1992), a espinabilidade do muco parece ser dependente do grau de purulência do mesmo. Este autor e seus colaboradores descreveram que amostras de muco purulentas exibem valores significativamente mais baixos de espinabilidade quando comparados aos valores de amostras de muco com aspecto mucóide. Este comportamento se confirma também no trabalho de Dumas (2004) que comparou a espinabilidade de cinco amostras purulentas e seis mucóides.

Segundo Puchelle (1988), o índice reológico de espinabilidade representa a força de coesão interna do muco, por isso, quanto maior espinabilidade do muco, maior é a ligação

estabelecida entre as suas macromoléculas pelas pontes de dissulfeto, mas sofre interferência da adesividade, que é uma propriedade da superfície do muco ligada ao epitélio e transportabilidade deste muco, que freqüentemente apresenta-se alterada nos portadores de Fibrose Cística (RATJEN, 2003).

Alguns sais, tais como cloreto de sódio, têm um bom efeito solubilizador sobre o muco brônquico. Moriarty (1991) descreve que isso acontece porque este sal é compatível com a atividade de degradação das enzimas presentes no muco. Porém o uso de diferentes soluções hipertônicas em forma aerossol é comum no tratamento de portadores de Fibrose Cística, provavelmente na tentativa de compensar as alterações de osmolaridade causadas pela tubulopatia obstrutiva, que altera os canais de sódio do epitélio pulmonar, ressecando o muco.

Apesar da expectativa de vida para os pacientes ter aumentado mais de 30 vezes desde 1940, quando os fibrocísticos morriam antes do primeiro ano de vida, ainda não temos um tratamento realmente eficaz para a FC nas vias respiratórias. Uma razão é que a causa de base da doença era desconhecida até à descoberta do gene regulador da condutância transmembranar da FC (CFTR) por Lap Chee Tsui e colegas em 1989. Tornou-se então aparente que o principal defeito molecular na FC era uma proteína defeituosa que normalmente atua como um canal de cloreto. Mas isso foi só o princípio: levou todos estes anos desde então para chegarmos ao que sabemos hoje em dia sobre como esta falha microscópica leva, com o tempo, ao pulmão infectado e danificado da FC.

Os conhecimentos não estão de modo algum completos, e terão que ser resolvidos muitos problemas. É fato que muitos portadores da FC que eram crianças hoje são adultos produtivos, mas viver com esta doença está longe da normalidade. Sendo uma doença relativamente rara, é difícil disponibilizar recursos para o desenvolvimento e testes de mucolíticos e outros tratamentos coadjuvantes com este trabalho, somado a muitos outros, espera-se sensibilizar o leitor para este problema, e deixar como alternativa de método investigativo a técnica fotoacústica.

11 CONCLUSÃO

- 1) A fotoacústica demonstrou ser um instrumento preciso, viável e de baixo custo no monitoramento do tempo de interação de solução salina hipertônica a 3%, 6% e N-acetilcisteína com muco brônquico de portadores de Fibrose Cística.
- 2) A comparação de substâncias mucolíticas de baixo custo é importante, considerando o longo tempo de tratamento e a realidade econômica do país.
- 3) A diferença no tempo de interação (Δt) e do momento de pico de interação (t_0) não foi significativa entre os grupos estudados.
- 4) O grupo dois, que utilizou solução salina 6% apresentou maior dispersão dos dados, mostrando um comportamento não homogêneo, o que pode ser considerado um critério para excluir o uso desta concentração.
- 5) Para definir critérios para escolha de um mucolítico, outros estudos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI-YAGI et al. Sputum induction as a research tool for the study of human respiratory mucus. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 145, p. 101 – 110, 2005.
- APP, E. M. et al. Dose-finding and 24-h monitoring for efficacy and safety of aerosolized nalcystelyn in cystic fibrosis. **Eur Respir J.**, v. 19, p. 294-302, 2002.
- BALDERAS-LÓPEZ, J. A. et al. Measurements of thermal effusivity of liquids using a conventional photoacoustic cell. **Rev of Scient Instr.**, v.70, p. 2069-2071, 1999.
- BALLMANN, M. Hypertonic saline and recombinant human Dnase: a randomised cross pilot study in patients with cystic fibrosis. **Jornal of Cystic Fibrosis**, v.1, p. 35 – 37, 2002.
- BERNENGO, J.C.; GASQUEZ, C.; FALSON-RIEG, F. Photoacoustics as tool for permeation studies. **High Temperatures-High Pressures**, v. 30, p. 619-624, 1998.
- BRAGA, P. C. Sinusoidal oscillations method. In: BRAGA, P. C; ALLEGRA, L. **Methods in bronchial mucology**. New York: Raven Press, 1988, p. 63-71.
- CATALDO, D. et al. Induced sputum-comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. **Chest**, v. 120, p. 1815-1817, 2001.
- I CONSENSO de fibrose Quística. **Arch.argent.pediatric**,v.1,p.188-224, 1999
- DANEL, C. J. Morphological characteristics of human airway structures. In: **Environmental impact on the airways: from injury to repair**. New York: Marcel Dekker, 1996, p. 19-35.
- DAVISKAS E. et al. Inhalation of hypertonic saline aerosol enhances mucociliary clearance in asthmatic and healthy subjects. **European Respiratory Journal**, V. 9, p. 725 – 732, 1996.
- DELGADO-VASALLO, O; MARÍN, E. The application of the photoacoustic technique to the measurement of the thermal effusivity of liquids. **J Phys D Appl Phys.**, v. 32, p. 593-597, 1999.
- DOULL, I. J. Recent advances in Cystic Fibrosis. **Arch Dis Child.**, v. 84, n.1, p. 62 – 66, 2001.
- DOLOVICH M. B. et al . Consensus statement : aerosols and delivery devices. **J Aerosol med.**, v. 13, p. 291 – 300, 2000.
- DONALDSON SH et al. Mucus clearance and lung function in Cystic Fibrosis with hypertonic saline. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n.3, p. 241 – 250, 2006.
- DORNELAS, Eduardo c.et al. Estudo do quadro pulmonar de pacientes com fibrose cística. **Jornal de Pediatria**, v.76, n.4, p.295-299,2000.

DUMAS L. V. F. et al Mudanças das propriedades reológicas do muco brônquico umedecido monitorado através de técnicas fotoacústicas. In: IV ENCONTRO AMERICANO de Pós – Graduação, **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

ELKINS M. R. A controlled trial of long – term inhaled hipertonic saline in patients with Cystic Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, v.. 354, n.3, p. 229 – 240, 2006.

ENG, P. A. et al., Short-term efficacy of ultrasonically nebulized hypertonic saline in cystic fibrosis. **Pediat Pulm.**, v. 21, p. 77-83, 1996.

GASTALDI, A. C; JARDIM, J. R; KING, M. The influence of temperature and length of storage of frog mucus samples. **Biorheology**, v. 37, p. 203-211, 2000.

GIRORD, S. et al. Role of the physicochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. **Eur Respir J.**, v. 5, p. 477-487, 1992.

GRAY, V. R. Surface aspects of wetting and adhesion. **Chemistry and industry**, v. 5, p. 969-978, 1965.

GUTIÉRREZ-JUÁREZ, G. et al. In vivo measurement of the human skin absorption of topically applied substances by photoacoustic technique. **Phys Meas.**, v. 23, p. 1-12, 2002.

HARDY, K. A. A review of airway clearance: new techniques, indications, and recommendations. **Respir Care**, v. 39, p. 440- 455, 1994.

HASHIMOTO, Y. et al. Influence of the rheological properties of airway mucus on cough sound generation. **Respirology**, v. 8, p. 45-51, 2003.

HENIG, N. R. et al. Sputum induction as a research tool for sampling the airways of subjects with cystic fibrosis. **Thorax**, v. 56, p. 306-311, 2001.

HILL S. L; WEBBER, B. Mucus transport and physiotherapy – a new series. **Eur Respir J.**, v. 13, p. 949-950, 1999.

HOUTMEYERS, E. et al. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. **Eur Respir J.**, v. 13, p. 1177- 1188, 1999.

JARDIM, J. R. et al. Produção e transporte de muco e drogas mucoativas. In: **Pneumologia: atualização e reciclagem**. São Paulo: Atheneu, 1999, p.10-18.

JARDIM.J.Consenso Latino americano sobre infecções em bronquite crônica.Relatório do grupo de consenso.**Revista Brasileira Clinica terapêutica**. v.23,p.132-144; 1997.

KIM, C. S. et al. A micro double capillary method for rheologic measurements of lower airway secretions. **Bull Eur Physiopath Resp.**, v. 18, p. 915-927, 1982.

KIM, C. S. et al. Influence of two-phase gas-liquid interaction on aerosol deposition in airways. **Am Rev Respir Dis.**, v. 131, p. 618-623, 1985.

KING, M. Magnetic microrheometer. In: BRAGA, P. C. **Methods in bronchial mucology**. New York:Raven Press, 1988, p. 73-83.

KING, M. et al. Rheology of cystic fibrosis sputum after in vitro treatment with hypertonic saline alone and in combination with recombinant human deoxyribonuclease I. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.156, p. 173-177, 1997.

KNOWLES M. R., et al. Abnormal respiratory epithelial ion transport in Cystic Fibrosis. **Clin Chest Med.**, v. 7, n.º p. 285 – 297.1986

LANDAU, L; AJIEZER, A; LIFSHITZ, E. **Curso de física geral: Mecânica y física molecular**. Moscú: MIR, 1979. p. 365.

LEIKAUF, G. D. et al. Mucin apoprotein expression in copd. **Chest**. v. 121, p. 166s-182s, 2002.

LORENZI- FILHO, G. et al. Correlation between rheological properties and in vitro ciliary transport of rat nasal mucus. **Biorheology**, v. 29, p. 433-440, 1992.

MACCHIONE, M. et al. Methods for studying respiratory mucus and mucus and clearance. **Braz J of Med and Biol Res.**, v. 28, p. 1347-1355, 1995.

MAJIMA, Y. Mucoactive medications and airway disease. **Paediat Respir Rev.**, v. 3, p. 104 - 109, 2002.

MAJIMA, Y. et al. Effects of clarithromycin on rheological properties of nasal mucus in patients with chronic sinusitis. **Ann Otol Rhinol.**, v. 109, p. 484-487, 2000.

MARTINS CSB, RIBEIRO AF. Frequency of the cystic fibrosis DF508 mutation in a population from São Paulo State,Brazil. **Braz J Med Biol Res.**, v.7, 285-97; 1986.

MITCHELL J. P., NAGEL M. W. In vitro performance testing of three small volume – holding chambers under conditions that correspond with use infants and small children. **J Aerosol med.**, v. 10, p. 341 – 349, 1997.

MILLA E C. Long term effects of aerosolised rhDNase on pulmonary disease progression in patients with Cystic Fibrosis. **Thorax**, v. 53, p. 1014 – 1017, 1998

MOIRA L. AITKEN et al. Analysis of sequential aliquots of hypertonic saline solution-induced sputum from clinically stable patients with Cystic Fibrosis. **Chest**, v. 123, p. 792 – 799, 2003.

MORGADO, Eletícia da Silva. Atuação da fisioterapia respiratória no tratamento do paciente com fibrose cística. **Revista do COFITO**, Rio de Janeiro; 2001. Disponível em: <<http://www.fisioterapia.com.br/publicações/artprfcistica.asp>>

MORIARTY, B. G et al. Nasal mucociliary function: comparison of saccharim clearance with ciliary beat frequency. **Rhinology**, v. 29, p. 173- 179, 1991.

- MUHLEBACH M. S. et al. Quantification of inflammatory responses to bacteria in young Cystic Fibrosis. **Am. J. Respir Crit Care Med.**, v. 160, p. 186 – 191, 1999.
- NONE L. V. et al. Aérosolthérapie. **EMC Médecine**, v. 2, p. 56 – 65, 2005.
- PAGGIARO P. L. Sputum induction. **Eur Respir J.**, v. 20, suppl.37, p. 3s – 8s, 2002.
- PIZZICHINI E. Safety of sputum induction. **Eur Respir J.**, v. 20, suppl.37, p. 9s – 18s, 2002.
- PALOMBINI, B. C; MIORIN, M. C. G. Expectoração, catarro, escarro e pigarro. In: PALOMBINI, B. C. et al. **Doenças das vias aéreas: uma visão clínica e integrada (viaerologia)**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001, p. 108-112.
- PRYOR, J. A. Physiotherapy for airway clearance in adults. **Eur Respir J.**, v. 14, p. 1418-1424, 1999.
- PUHELLE, E; ZAHM, J. M. Rheological properties other than viscoelasticity and adhesivity. In: BRAGA, P. C; ALLEGRA, L. **Methods in bronchial mucology**. New York:Raven Press, 1988, p. 135-139.
- RAMOS D. et al. Efeitos aerossolterapia nas propriedades físico-químicas do muco brônquico. **Revista brasileira de fisioterapia**, v. 8/1, p. 61 – 66, 2004.
- RATJEN F. Cystic Fibrosis. **Lancet**, v.361,;:681-22; 2003.
- RASKIN S. et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. **Am. J. Med. Gen.**, v.46, 665-669; 1993.
- RIBEIRO J. D. et al. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. **Jornal de Pediatria**, v. 78, supl. 2, 2002.
- RIEDLER, J. et al. Inhaled hypertonic saline increases sputum expectoration in cystic fibrosis.: **Journal pediatric child health**, Australia, v.1 ,n.32, p.48-50, Feb;1996.
- ROBINSON, M. et al. Effect of hypertonic saline, amiloride, and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.153, p. 1503-1509, 1996.
- RODWELL L.T; ANDERSON S. D. Airway responsiveness to hyperosmolar saline challenge in cystic fibrosis: a pilot study. **Pediatr Pulmonol.**, v.21, p.282-289, Mai.,1996.
- ROSE, V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. **Euro. Respir. J.**, v. 19, n.2, p. 333-340, 2002
- ROSENCWAIG, A; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. **J Appl phys.**, v. 47, p. 64-69, 1976.

- ROSENCWAIG, A. Studies in biology. In: _____. **Photoacoustic and photoacoustic spectroscopy**. New York, John Wiley & Sons, 1980, p. 207-218.
- ROZOV, Tatiana. **Mucoviscidose: Fibrose Cística do Pancreas**. In: _____. **Doenças Pulmonares em Pediatria: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 443-459
- SALDIVA, P. H. N. Bases anatômicas e funcionais do trato respiratório. In: _____. **Doenças pulmonares em pediatria: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Atheneu, 1999, p. 3-19.
- SALDIVA, P. H. N. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. **Jornal de Pneumologia**. v. 16, n.3, p. p. 161-170, 1990.
- SANTOS, J. W. A. et al. Discinesia ciliar primária. **Jornal de Pneumologia**. v. 27, n.5, p. 262-268, 2001.
- SCHEICHER M. E. et al. Indução de escarro: revisão da literatura e proposta de protocolo. **São Paulo Méd. J.**, v. 121, p. 213 – 219, 2003.
- SHIBUYA, Y; WILLS, P; COLE, P. J. The effect of erythromycin on mucociliary transportability and rheology of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum. **Respiration**, v. 68, p. 615-619, 2001.
- SILVEIRA, P. S. P. et al. Computer-assisted rheological evaluation of microsamples of mucus. **Comp Meth and Prog in Bio.**, v. 39, p. 51-60, 1992.
- SPENCER H. ; JAFFE A. Newer therapies for cystic fibrosis. **Current paediatrics**, v.13,:259-263; 2003.
- SURI R. et al. Effects of Recombinant Human Dnase and Hipertonic Saline on Airway Inflammation in Children With Cystic Fibrosis. **Am J Resp Crit Care Med.**, v. 166, p. 352 – 355, 2002.
- SURI R. The use of human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of cystic fibrosis. **BIODRUGS**, v. 19, n.3, p. 135 – 144, 2005.
- TAM, A. C. Applications of photoacoustic sensing techniques. **Rev Mod Phys.**, v. 58, p. 381-431, 1986.
- TARANTINO, A.B. O pulmão como órgão de defesa. In: _____. **Doenças pulmonares**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 179–188.
- VAN DER SCHANS , C.P. et al. Chest phytotherapy compared to no chest phytotherapy for cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev.**, v.326, p.1187-91, 1992.
- TOMASHEFSKI Jr, J.F. et al. Regional distribution of macroscopic lung disease in cystic fibrosis . **Am Rev Respir Dis.**, v.133, n.4, p.535-540, 1986.

VAN DER SCHANS, C. P. et al. Airway clearance techniques. In: AMBROSINO, N; DONNER, C. F; RAMPULLA, C. **Advances in Rehabilitation-Topics in Pulmonary Rehabilitation**. Italy: Maugeri Foudation Books, 1999. v. 7, p. 229-241.

VARGAS, H; MIRANDA, L. C. M. Photoacoustic and related photothermal techniques. **Phys. Rep.**, v. 161, p. 43-101, 1988.

WANNER, A; SALATHÉ, M; O'RIORDAN, T. G. Mucociliary clearance in the airway. **Am J Crit Care Med.**, v. 154, p. 1868-1996, 1996.

WARK, P.A.; McDONALD, V. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev.**, CD001506, Australia, 2005.

WILDHABER J. H. et al. Inhalation therapy in asthma: nebulizer or pressurized metered dose inhaler? In vivo comparison of lung deposition in children. **Eur Respir J.** v. 12, p. 378s, 1998.

WILLS, P et al. Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis aputum on the mucus-depleted bovine trachea. **Jornal Clinical Investigation.** v. 99, n. 1, p. 9-13, 1997.

ZIN, W. A; ROCCO, P. R. M. Mecanismos de defesa das vias aéreas. In: _____. **Fisiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 549-552.

Anexo A
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP UNIVAP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L183/2005/CEP sobre *“Monitoramento da ação de substâncias mucoativas em muco brônquico humano de portadores de Fibrose Cística por meio da técnica fotoacústica”*, sob a responsabilidade de Cristiane Ribeiro Junqueira, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, conforme Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 20 de novembro de 2005.



PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA

P.P. Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade do Vale do Paraíba - Univap

Anexo B
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar colaborar com o estudo doando o catarro expedido durante a sessão de fisioterapia, assine o final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e outra do pesquisador responsável, no caso a professora Cristiane Ribeiro de Andrade Junqueira. Em caso de recusa você não será penalizado ou prejudicado de forma alguma. Em caso de dúvida pode procurar a professora na clínica de fisioterapia da universidade de Vila Velha, ou pelo telefone: (27) 33297170, mesmo em ligações a cobrar.

Nome da pesquisa:

Monitoramento da interação de substâncias mucoativas em muco brônquico humano de portadores de fibrose cística por meio da técnica fotoacústica

- a) Esta pesquisa está sendo realizada com o catarro que é eliminado pelo paciente portador de fibrose cística, onde vão ser testados e comparados três tipos de substâncias que fluidificam este catarro.
- b) Nada vai ser testado no paciente, nem antes, durante ou depois da sessão de fisioterapia, a sessão será a mesma que o paciente está habituado a fazer. Será utilizado o catarro que seria jogado no lixo.
- c) Para doar o catarro o paciente deverá cuspi-lo em um copo descartável durante a sessão de fisioterapia. Este catarro será congelado e levado para análise na Universidade do Vale do Paraíba em São José dos Campos, estado de São Paulo.
- d) O nome e endereço do paciente não vão aparecer em nenhum documento da pesquisa, nem sua imagem, será divulgada apenas a idade, sexo e o número de participantes. Assim a identificação do paciente não será possível e a divulgação dos resultados da pesquisa. Garantindo total sigilo sobre sua colaboração.
- e) As objetivas desta pesquisa são buscar novas alternativas de tratamento para a dificuldade do paciente portador de fibrose cística em expelir seu catarro.
- f) O paciente não é obrigado a participar da pesquisa.
- g) A pesquisa não está vinculada com seu tratamento, em caso de recusa o tratamento seguirá normalmente.
- h) Nenhum tipo de favorecimento, ajuda financeira, ou qualquer remuneração será oferecida aos participantes, em nenhum momento da pesquisa. Os que desejarem participar serão voluntários.
- i) O voluntário pode recusar ou retirar seu consentimento em qualquer momento da pesquisa.
- j) As dúvidas que surgirem durante qualquer momento podem ser esclarecidas pela professora Cristiane Ribeiro de Andrade Junqueira.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito:

Eu,-----
-----, RG:-----CPF-----, abaixo assinado, concordo em participar do estudo-----

-----, como sujeito doador de catarro(muco). Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Cristiane Ribeiro de Andrade Junqueira sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve à qualquer penalidade ou interrupção do meu tratamento/acompanhamento/assistência.

Local e data-----

Nome e assinatura do sujeito ou responsável:-----

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)