(11) Número de Publicação: **PT 748228 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 33/14 (2007.10) ***A61K 31/7004*** (2007.10)
A61K 9/14 (2007.10) ***A61P 11/10*** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1995.02.23**

(30) Prioridade(s): **1994.02.25 AU PM4114/94**

(43) Data de publicação do pedido: **1996.12.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.07.21**
179/2010

(73) Titular(es):
SYDNEY SOUTH WEST AREA HEALTH SERVICE
EASTERN CAMPUS LIVERPOOL HOSPITAL
ELIZABETH STREET LIVERPOOL NSW 2170 AU

(72) Inventor(es):
SANDRA DOREEN ANDERSON **AU**

(74) Mandatário:
MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO E DISPOSITIVO PARA PROVOCAR O ESTREITAMENTO DA PASSAGEM DE AR E/OU A INDUÇÃO DA EXPECTORAÇÃO**

(57) Resumo:
UM MÉTODO CONFORME DESCRITO PARA TESTAR A SUSCEPTIBILIDADE DE UMA PESSOA À ASMA. A PESSOA INALA UMA QUANTIDADE EFICAZ DE CLORETO DE SÓDIO, MANITOL OU OUTRA SUBSTÂNCIA CAPAZ DE ALTERAR A OSMOLARIDADE DO LÍQUIDO DA SUPERFÍCIE DAS VIAS AÉREAS NO INDIVÍDUO. A SUBSTÂNCIA ESTÁ NA FORMA DE UM PÓ SECO DISPERSÁVEL CONTENDO UMA PROPORÇÃO EFICAZ DE PARTÍCULAS DE UM TAMANHO RESPIRÁVEL. O INDIVÍDUO É ENTÃO AVALIADO PARA DETECTAR O ESTREITAMENTO DAS VIAS AÉREAS O QUAL É INDICATIVO DA PROPENSÃO PARA ASMA. A MESMA TÉCNICA DE INALAÇÃO DO PÓ SECO PODE SER USADA PARA TESTAR A SUSCEPTIBILIDADE DE UMA PESSOA À RINITE, PARA INDUZIR A EXPECTORAÇÃO E PROMOVER A DEPURAÇÃO MUCOCILIAR.

RESUMO

"MÉTODO E DISPOSITIVO PARA PROVOCAR O ESTREITAMENTO DA PASSAGEM DE AR E/OU A INDUÇÃO DA EXPECTORAÇÃO"

Um método conforme descrito para testar a susceptibilidade de uma pessoa à asma. A pessoa inala uma quantidade eficaz de cloreto de sódio, manitol ou outra substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas no indivíduo. A substância está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de um tamanho respirável. O indivíduo é então avaliado para detectar o estreitamento das vias aéreas o qual é indicativo da propensão para asma. A mesma técnica de inalação do pó seco pode ser usada para testar a susceptibilidade de uma pessoa à rinite, para induzir a expectoração e promover a depuração mucociliar.

DESCRIÇÃO
"MÉTODO E DISPOSITIVO PARA PROVOCAR O ESTREITAMENTO DA PASSAGEM DE AR E/OU A INDUÇÃO DA EXPECTORAÇÃO"

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com o uso de substâncias secas em pó para induzir uma mudança na osmolaridade das vias aéreas para induzir estreitamento e/ou a indução de expectoração.

A asma é uma doença crónica inflamatória das vias aéreas resultando na hiper-reactividade brônquica a uma vasta variedade de estímulos químicos, físicos, e alergéneos. Esta sensibilidade é manifestada pelo estreitamento das vias aéreas e pela redução no volume expiratório forçado em um segundo (FEV_1).

O teste de broncoprovocação, medindo as variações em FEV_1 em resposta aos estímulos inalados, é bem estabelecido como uma técnica para identificar e avaliar a severidade da hiper-reactividade das vias aéreas em pessoas suspeitas de terem asma (J Allergy Clin Immunol 1979; 64:1-250, Sterk *et al* Eur Respir J 1993, 6 (Sup 16):53-83.

Os agentes provocadores mais comummente usados são histamina e metacolina que actuam directamente nos receptores específicos nas vias aéreas causadoras de contracção do músculo liso brônquico. Ensaios com estes agentes têm uma alto valor preditivo negativo mas uma baixa especificidade para a asma quando realizados numa população aleatória. Recentemente tem havido problemas com a disponibilidade destes agentes e acreditação para a sua

utilização em seres humanos. Actualmente, o único produto aprovado para uso humano pela Federal Drug Administration nos EUA é a Provolina (Hoffman La Roche) a qual é cloreto de metacolina.

Teste de broncoprovocação com pós secos contendo partículas respiráveis de alergéneos (e.g. farinha, pó de madeira de cedro vermelho, resinas, gomas) têm também sido usados para identificar alergéneos específicos com vista a estabelecer uma relação entre a exposição ao agente suspeito e o início da asma. Estes são os mais comummente usados para investigar a asma ocupacional.

Nos últimos 10 anos o laboratório dos inventores tem desenvolvido e uniformizado um teste de broncoprovocação usando aerossóis húmidos de soro fisiológico hiperosmolar gerado por um nebulizador ultra-sónico (Anderson *et al.*, in Provocation Testing in Clinical Practice, pp 249-278, Marcel Dekker Inc. 1994). Este teste está agora bem estabelecido nos Laboratórios por toda a Austrália e está listado no Medical Benefits Schedule Book. Este teste de provocação está também incluído no relatório do grupo de trabalho da Comunidade Europeia para o Carvão e o Aço (Sterk *et al.*, Eur Respir J, 1993, 6 (Sup 16):53-83). Ele tem sido recomendado recentemente pela Comissão de broncoprovocação do Estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância.

O soro fisiológico hiperosmolar de provocação parece ser uma técnica muito útil para identificar pessoas com asma corrente e aqueles que sofrem de asma induzida pelo exercício. É também muito útil para avaliar os fármacos usados nos tratamentos da asma.

A maior desvantagem de usar aerossóis húmidos de soro fisiológico hiperosmolar é que é necessário um nebulizador ultra-sónico e este é dispendioso. Outra desvantagem é que os nebulizadores ultra-sónicos requerem manutenção para limpeza e esterilização. Para além disso, é necessário um aparelho de pesagem para medir o resultado para cada teste dado que os nebulizadores diferem no resultado ao longo do tempo e de um aparelho para outro. Outra desvantagem, tal como com outros aerossóis húmidos, é que a pessoa que administra o ensaio também está exposta ao aerossol uma vez que mais de metade da quantidade gerada pelo nebulizador é expelida para o ambiente. Para além disso o pessoal está também exposto à saliva do paciente. Há ainda algumas dificuldades encontradas pelo doente e estas incluem o uso de uma cavilha no nariz, a produção de muita saliva e o sabor a sal. O tempo requerido para realizar o ensaio com um aerossol húmido num asmático leve ou num controlo saudável pode ser de 70 minutos. Isto inclui a preparação da solução e do aparelho (cerca de 10 minutos), tempo de ensaio actual o qual para asmáticos leves pode ser de até 30 minutos, e finalmente limpeza e esterilização após o ensaio (cerca de 30 minutos).

É também sabido que os aerossóis húmidos de sal podem ser usados com o objectivo de aumentar a depuração mucociliar e induzir a expectoração num indivíduo. Esta técnica tem sido usada desde os anos 1970 pelos fisioterapeutas para aumentar a depuração das secreções das vias aéreas dos indivíduos com fibrose quística e bronquite. Nos últimos anos, a técnica tem sido usada em pacientes com HIV que são suspeitos de terem *Pneumocystis carinii* que causa pneumonia e necessita de ser tratado. A análise da expectoração em

pacientes suspeitos de terem tuberculose é também conhecida como uma técnica simples de pesquisar a doença.

Com o aumento da osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas, a água move-se na direcção do lúmen das vias aéreas. Este movimento da água e o aumento da depuração mucociliar induzida pela hiperosmolaridade também estimula a produção de expectoração. O problema associado com este tratamento é semelhante ao problema associado com o teste de soro fisiológico hiperosmolar para a determinação do estreitamento das vias aéreas. É necessário um nebulizador dispendioso para realizar este procedimento.

BREVE DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece uma substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas num indivíduo, substância essa que está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de um tamanho respirável, no fabrico de um agente em pó seco para o diagnóstico da asma e/ou da susceptibilidade à asma num indivíduo, em que a substância é seleccionada do grupo compreendendo sais minerais, açúcares e açúcares álcoois.

Num segundo aspecto, a presente invenção fornece uma substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas num indivíduo cuja substância está na forma de um pó dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de um tamanho respirável, em que a substância é seleccionada a partir do grupo compreendendo sais minerais, açúcares e açúcares álcoois para uso no diagnóstico de asma e/ou de susceptibilidade à asma num indivíduo.

Num outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas num indivíduo cuja substância está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de tamanho respirável, no fabrico de um agente em pó seco para aumentar a depuração mucociliar num indivíduo e/ou para induzir a expectoração num indivíduo com essa necessidade, em que a substância é seleccionada a partir do grupo que compreende sais minerais, açúcares e açúcares álcoois.

Num quarto aspecto, a presente invenção fornece uma substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas num indivíduo cuja substância está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de tamanho respirável, em que a substância é seleccionada a partir do grupo que compreende sais minerais, açúcares e açúcares álcoois para uso no aumento da depuração mucociliar num indivíduo com essa necessidade e/ou para induzir a expectoração num sujeito com essa necessidade.

A administração de um ensaio hiperosmolar a um indivíduo na forma de um pó seco em vez de um aerossol húmido permite que o teste seja administrado através de um inalador convencional de pó seco em vez de ser através de um nebulizador. Isto é altamente vantajoso dado que estes inaladores são muito baratos e largamente disponíveis. O tempo para realizar um ensaio é reduzido para metade, dado não haver limpeza, esterilização, manutenção ou pesagem envolvidos no uso do teste de pó seco. Parecia também que é necessário administrar doses mais pequenas da substância do ensaio no estado seco para atingir a resposta desejada do

que as necessárias com essa substância na forma de um aerossol húmido.

Conforme aqui usado nesta especificação, o termo "vias aéreas" inclui quer as vias aéreas superiores do nariz como as vias aéreas inferiores dos pulmões. Enquanto que a invenção é particularmente aplicável neste último caso, ela é também aplicável no primeiro caso para a detecção de rinite real ou incipiente, a qual pode ser devida ao ar seco ou a alergéneos, e condições semelhantes. Enquanto que a invenção é daqui em diante descrita com particular referência às vias aéreas inferiores, este conhecimento pode ser aplicado com igual efeito para as vias aéreas do nariz.

A substância para ser inalada é uma substância que é biologicamente compatível com o indivíduo e é capaz de alterar, normalmente aumentando, a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas do indivíduo.

A substância é um sal mineral ou um açúcar ou açúcar álcool, mais preferencialmente é seleccionada a partir do grupo que compreende sais de sódio e potássio, açúcares hexoses e pentoses e os seus correspondentes açúcares álcoois. É mais preferido que a substância seja seleccionada a partir do grupo que compreende cloreto de sódio, cloreto de potássio, manitol e dextrose. Dos grupos mais preferidos de substâncias, o cloreto de sódio e o manitol são os mais preferidos devido ao seu baixo custo, à sua disponibilidade no tamanho de partícula requerido e na sua compatibilidade biológica.

A substância precisa ser inalada nas vias aéreas, geralmente nas primeiras 8-12 gerações, e é necessária uma que uma quantidade eficaz se deposite na superfície das vias aéreas. Preferencialmente, a substância contactará com a superfície das vias aéreas nas primeiras doze gerações das vias aéreas. Para que isto aconteça é necessário que a substância inalada esteja presente inicialmente em quantidade suficiente, para que seja suficientemente dispersável de modo a que possa ser arrastada pela respiração inalada do indivíduo ou por um gás propulsor, e uma proporção suficiente tem de ser de um tamanho de partícula respirável. O termo "tamanho de partícula respirável" é tomado para significar um tamanho que é suficientemente pequeno para a partícula não se depositar ou colidir contra a garganta do indivíduo em vez de ser dirigida para as vias aéreas dos pulmões do indivíduo. Na prática verificou-se que as partículas com menos de cerca de sete microns são respiráveis.

No caso em que é desejado induzir o estreitamento das vias aéreas, tal como para os testes para a asma, pode ser desejável que a maior parte possível do pó seja de um tamanho de partícula respirável de modo a reduzir a impactação na orofaringe. Neste caso, as partículas na gama respirável compreendem preferencialmente pelo menos 10% da substância em peso, mais preferencialmente pelo menos 25%, ainda mais preferencialmente pelo menos 40% e o mais preferencialmente pelo menos 50%. Em contraste, no caso em que é desejado induzir a expectoração pode ser desejável incluir tanto as partículas respiráveis como as partículas não respiráveis dado que as últimas podem induzir tosse a qual poderá ela própria ajudar na produção de expectoração. A dose desejada em qualquer dos casos dependerá das

circunstâncias individuais e deverá ser seleccionada pelo pessoal de cuidados de supervisão de saúde.

A substância pode ser usada para testar indivíduos quanto à sua susceptibilidade à asma. Neste caso, o indivíduo pode ser administrado com uma série de testes de doses cada vez mais elevadas da substância seleccionada. Após cada teste, o indivíduo será avaliado quanto ao estreitamento das vias aéreas, normalmente medindo o volume respiratório forçado em 1 segundo (FEV_1). Outros métodos conhecidos para medir os parâmetros indicativos do estreitamento das vias aéreas pode igualmente ser bem usado e a resistência das vias aéreas é usualmente usada para o nariz. Será apreciado que em muitos casos não há estreitamento o que é indicativo de uma propensão negativa para a asma ou rinite. No caso dos indivíduos susceptíveis à asma haverá um estreitamento das vias aéreas proporcional à sensibilidade do indivíduo à dose eficaz da substância administrada, ou seja a dose que realmente atinge a superfície das vias aéreas. Em cada caso, o parâmetro indicativo da resistência ao fluxo de ar após o ensaio é comparado com o mesmo parâmetro medido antes do ensaio para indicar a presença ou ausência de estreitamento das vias aéreas.

A substância é preferencialmente acondicionada numa cápsula dura quebrável, e.g. gelatina. As cápsulas contêm preferencialmente doses desde 1 até 100 mg, preferencialmente 5 até 40mg no caso dos testes de provocação para asma ou rinite. No caso de indução da expectoração e de depuração mucociliar, doses mais elevadas podem provar ser mais desejáveis em indivíduos em que o estreitamento das vias respiratórias não seja uma preocupação. No caso em que é desejado induzir a

expectoração em asmáticos ou aumentar a depuração mucociliar pode ser necessário pré-medicar o indivíduo com um agonista dos receptores beta-adrenérgicos, Intal ou Nedocromil de sódio antes do tratamento para prevenir o estreitamento das vias aéreas.

A substância quando usada para a indução de expectoração pode ser usada não apenas para colher a expectoração para analisar a presença de agentes patogénicos virais ou microbianos mas também em asmáticos para colher células inflamatórias dos pulmões. Isto permite que o estado de activação destas células inflamatórias seja determinado sem colheita invasiva das células ao indivíduo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um gráfico que mostra a percentagem de FEV_1 previsto para indivíduos saudáveis e asmáticos antes e depois de um ensaio de pó seco de acordo com a presente invenção;

A Figura 2 é um gráfico que mostra a dose de pó seco relativa à dose de aerossol húmido necessária para causar uma resposta asmática em indivíduos susceptíveis;

A Figura 3 é um gráfico que mostra a resistência ao fluxo de ar nasal antes e depois de uma provocação com pó seco de acordo com a presente invenção; e

A Figura 4 é um gráfico que mostra a resistência ao fluxo de ar nasal antes e depois de duas provocações de pó seco sucessivas de acordo com a presente invenção.

MELHOR MÉTODO PARA REALIZAR O OBJECTIVO DA INVENÇÃO

Para estabelecer a eficácia do uso de um sistema em cápsula para administrar partículas de cloreto de sódio ou de manitol para induzir estreitamento da vias aéreas em pacientes a serem tratados para a asma.

INDIVÍDUOS

Asmáticos nascidos entre 30 de Junho de 1951 e 19 de Agosto de 1975 com idades entre 19-55 anos foram recrutados da comunidade local. Foram todos reconhecidos clinicamente como asmáticos e tinham sido tratados para esta doença. Todos os indivíduos eram não fumadores, tinham uma linha de base de volume respiratório forçado em um segundo (FEV_1) maior que 50% e uma dose de provocação de soro fisiológico a 4,5% para causar uma queda de 20% de FEV_1 (PD_{20}) < 30 mL.

O protocolo para o ensaio de soro fisiológico a 4,5% foi o descrito por Rodwell *et al* 1992, (American Review of Respiratory Disease, 1992; 146: 1149-55). Foram excluídos do estudo os indivíduos que tinham tido uma infecção no peito nas seis semanas anteriores. Os indivíduos não podiam ter tomado broncodilatadores nas seis horas antes da visita ao laboratório, nenhuns corticosteróides foram tomados no dia do estudo nem nenhum anti-histamínico durante os três a cinco dias antes do dia do estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética do Hospital Royal Prince Alfred e a todos os indivíduos foi pedido para assinarem um termo de consentimento antes de começar o estudo. O estudo foi realizado sob o Sistema de Notificação de Ensaios Clínicos (CTN No 94-492,94-633) da Administração de Bens Terapêuticos do Departamento de Saúde da Commonwealth na Austrália.

MÉTODO

Delineamento experimental

Na primeira visita ao laboratório, cada indivíduo realizou um teste com soro fisiológico hiperosmolar padrão com 4,5% de soro fisiológico aplicado com um nebulizador ultra-sónico. Eles foram incluídos no estudo se tivessem uma redução de 20% na FEV_1 provocada por este ensaio. Uma resposta asmática é considerada como uma redução de FEV_1 maior que 15% do valor de pré-ensaio. Eles voltaram ao laboratório 2 a 5 vezes. Um período mínimo de 48 horas separou cada visita. Em pelo menos uma dessas ocasiões, eles inalaram um pó seco encapsulado de cloreto de sódio ou de manitol. Dezassete indivíduos realizaram o ensaio com cloreto de sódio usando um Halermatic (Fisons Pharmaceuticals) (Experiência 1), treze indivíduos realizaram um ensaio com manitol (Experiência 2) e 10 desses mesmos indivíduos realizaram também um ensaio com cloreto de sódio seco (Experiência 3) usando um Inalador Ingelheim (Boehringer Ingelheim).

Preparação e dispositivo para administrar pó:

Pós secos de cloreto de sódio ou manitol foram preparados para atomização a seco de uma solução aquosa e moída, se necessário, de modo a que o tamanho de partícula fosse na faixa do respirável (< 7 microns). O pó foi produzido pela Genentech Inc, South San Francisco, Califórnia e enviado em frascos de 400 ou 600 mg para o nosso laboratório. Havia dois lotes de cloreto de sódio e um de manitol. Quantidades dos pós secos, determinadas gravimetricamente (alteração das conhecidas, conhecidas podem ser preferível), (5, 10, 20 e 40 mg) foram acondicionadas em cápsulas duras de gelatina (Gallipot, St Paul, Minn. 55120) pelo pessoal do

nosso laboratório. Com vista a reduzir qualquer possibilidade de re-hidratação, isto foi realizado sob condições de ar controladas (temperatura 16°- 20°C humidade relativa 40%).

Administração do pó aos indivíduos:

Tanto o Halermatic como o Inalador Ingelheim foram carregados com uma cápsula contendo 5, 10, 20, ou 40 mg de cloreto de sódio ou manitol. A cápsula foi quebrada e o indivíduo inalou uma ou duas vezes para esvaziar a cápsula.

Medição das taxas de fluxo

A taxa de fluxo respiratório através do Halermatic foi medida indirectamente medindo a variação da pressão na boca (Viggo-Spectromed DTX Disposable Pressure Transducer, Oxnard, Calif., EUA) durante uma inspiração forçada máxima e foram registados valores entre 29-188 L/min (Miniwriter Type WTR771A, Watanabe Instruments Corp). As taxas de fluxo baixas são devidas à resistência do dispositivo. Para o Inalador Ingelheim a taxa de fluxo respiratória foi medida ligando-o a um Autoespirómetro Minato (AS 800, Osaka, Japão) tendo sido pedido ao indivíduo para realizar uma manobra de inspiração máxima através de um Inalador Ingelheim vazio no início de cada dia de estudo. O Minato AS 800 foi calibrado usando um rotâmetro e fluxo variável.

Medição da resposta:

- A FEV_1 foi medida (Minato Autospirometer AS300, Minato Medical Science Co Ltd, Osaka, Japan) em duplicado, 60 segundos após a administração da cápsula.
- O valor mais alto foi tomado para calcular a resposta das vias aéreas.

- A redução no FEV_1 para cada dose foi expressa como percentagem do valor de FEV_1 medido 60 segundos após uma manobra de inalação ter sido feita a partir do inalador contendo uma cápsula vazia.
- O ensaio foi iniciado dando uma cápsula vazia. A dose foi iniciada com 5 mg e foi duplicada a cada exposição até uma dose cumulativa de 635 mg (5, 10, 20, 40, 2 × 40, 4 × 40, 4 × 40 mg). Este protocolo para dosagem foi modificado repetindo a mesma dose se o indivíduo teve uma redução 'significativa' na FEV_1.
- Os indivíduos realizaram espirometria durante pelo menos 30 minutos após a conclusão de cada ensaio para avaliar a recuperação espontânea.
- A resposta das vias aéreas foi expressa em termos da dose administrada que foi necessária para provocar uma redução de 20% no FEV_1 (PD 20). Os valores para uma queda de 15% no FEV_1 podiam também ter sido usados (PD_{15}). Estes valores foram obtidos por interpolação linear a partir de um gráfico relacionando a % de queda do FEV_1 em relação à dose de cloreto de sódio ou manitol aplicada.

Medida do tamanho de partícula

O tamanho de partícula foi medido num impactor líquido multifase (Astra Pharmaceuticals). Este dispositivo mede partículas na gama de 13-6,8 μm, 6,8-3,1 μm e <3,1 μm. Este dispositivo foi usado para medir a dose de cloreto de sódio que estava na gama respirável (<6,8 μm). Para isto, 25 mL de cloreto de sódio ou manitol de osmolaridade conhecida foram colocados em cada uma das 3 fases do impactor. Três cápsulas de 40 mg de cloreto de sódio ou manitol foram colocadas no Halermatic ou num Inalador e o pó foi

retirado, por uma bomba de vácuo, através do impactor por via de uma 'garganta' a 60 L/min. Foi medida a osmolaridade do fluído nas 3 fases. Estes resultados mostraram que, para o cloreto de sódio administrado pelo Halermatic, aproximadamente 30% estavam dentro da gama respirável. Para o manitol por via do Inalador Ingelheim foram 22% e para o cloreto de sódio por via do Inalador foi 16%.

ESTATÍSTICAS:

A média geométrica e os intervalos de segurança de 95% foram calculados para a PD_{20} para o ensaio de aerossol húmido com soro fisiológico a 4,5% e o ensaio de pó seco com cloreto de sódio e manitol. Foi realizado um teste de t emparelhado, após transformação log dos valores. O pré-ensaio da função pulmonar (FEV_1) foi também comparado usando um teste t emparelhado. A relação entre a PD_{20} com o manitol e cloreto de sódio a seco e o soro fisiológico a 4,5% a húmido foi determinada usando um coeficiente de correlação de Piersons. Um valor de $p<0,05$ foi tomado como significativo.

Valores de Referência

Para a espirometria foram tomados a partir de Goldman & Becklake (Am Rev Respir Dis 1956;79:457-467) ou para os estudos com o Inalador Ingelheim a partir de Quanjer *et al* (Eur Resp J 1993; 6 (Supp 16) 5-40).

São tomados valores de referência para respostas normais para o soro fisiológico a 4,5% a partir de Smith & Anderson (Eur Respir J 1990; 3:144-151). O limite superior da queda de FEV_1 nos indivíduos de controlo saudáveis é de 12%.

Indivíduos Asmáticos

Os resultados são apresentados nas três tabelas de acompanhamento e ilustrados nas Figuras 1 & 2 para todos os testes. A medicação asmática correntemente a ser usada pelos indivíduos, a FEV_1 como uma percentagem do valor predito na visita inicial (dia do controlo), os valores de PD_{20} para o ensaio a húmido com o aerossol de soro fisiológico a 4,5%, o pó seco de manitol ou cloreto de sódio são dados nas Tabelas 1-3 para todos os indivíduos. Para muitos indivíduos foi realizado um segundo ensaio com o pó seco para demonstrar a reprodutibilidade da resposta das vias aéreas. Para um dos estudos, alguns dos indivíduos realizaram também um ensaio de provocação usando metacolina e os valores PD_{20} para estes indivíduos são dados na Tabela 2. Não há diferenças significativas para os valores da FEV_1 do pré-ensaio em cada dia de estudo ou para o PD_{20} provocado pela cápsula em dois dias de teste para qualquer das Experiências.

A Figura 1 ilustra, para cada teste, os valores de FEV_1 do pré ensaio e do ensaio final expressos como uma percentagem do valor normal predito. Isto demonstra claramente que a resposta das vias aéreas ao ensaio do pó seco foi diferente entre os indivíduos de controlo saudáveis e os indivíduos asmáticos e que as vias aéreas dos indivíduos asmáticos estreitaram em resposta à inalação dos pós secos (em todos os casos excepto num). A Figura 2 ilustra o PD_{20} para os pós secos de cloreto de sódio e manitol em relação ao aerossol húmido de soro fisiológico a 4,5%. Isto demonstra que os indivíduos foram, de algum modo, mais sensíveis à inalação dos pós secos de cloreto de sódio e manitol, em comparação com o aerossol húmido de soro fisiológico a 4,5% administrado numa dose semelhante. Isto foi particularmente evidente na Experiência 1 onde foi necessária uma dose

significativamente menor de pó seco de cloreto de sódio para produzir uma queda de 20% na FEV_1 comparada com o aerossol húmido ($p<0,02$).

TABELA 1	EXPERIÊNCIA 1							
	PÓ SECO DE CLORETO DE SÓDIO VIA HALERMATIC							
		Esteróides		% FEV1 Pred		Soro fisiológico 4,5%	NaCl #1	NaCl# 2
Nº do Indivíduo	Medicações	Dose	Duração			PD20	PD20	PD20
		(µg/dia)	(Mês)	Dia de Controlo		(mg)	(mg)	(mg)
1	Fenoterol			96,8		651,2	146	127
2	Salbutamol	BUD 800	3	94,2		149,4	161	96
3	Salbutamol			119,7		295,2	155	162
4	Salbutamol			88,1		249,8	121	118
5	Salbutamol			110,3		508,5	423	588
6	Salbutamol			75,7		232,7	126	105
7	Salbutamol			106,2		153,0	20,45	75,69
8	Salbutamol			103,3		166,5	106	52
9	Salbutamol			80,1		79,7	29	40
10	Terbutalina	BUD 1200	24	146,6		913,5	493,5	502,9
11	Salbutamol			86,4		725,4	36,1	79,5
12	Salbutamol	BEC 500	4	122,4		515,3	340,7	268,6
13	Terbutalina prn	BUD 800	6	81,5		205,7	257,99	128,8
14	Salbutamol	BEC 1000	48	66,2		58,5	87,93	132,03

15	Salbutamol	BUD 2000	23	76,3		16,7	19,4	62,9
16	Salbutamol			88,2		254,3	630	283,1
17	Salbutamol	BEC 400	48	79,6		137,7	52,6	19,16
			Média	95,4	Média geométrica	215,23	116,3	116,8
			DP	20,6	IC 95%	[128,3, 361,2]	[66,53, 203,4]	[74,6, 183,1]
						N = 17	N = 17	N = 17
						P = 0,02		NS
						n=17		n=17

TABELA 2	EXPERIÊNCIA 2								
	PÓ SECO DE MANITOL VIA INALADOR INGELHEIM								
		Esteróides		% FEV1 Pred		Soro fisiológico 4,5%	Manitol #1	Manitol #2	Mecolina
Nº do Indivíduo	Medicações	Dose	Duração	Pré-teste		PD20	PD20	PD20	PD20
		(µg/dia)	(Mês)	Dia de Controlo		(mg)	(mg)	(mg)	(µmol)
1	Salbutamol			100		296,1	92	102	3,12
2	Salbutamol	BECL 400	72	102		32,85	61,7	43,1	0,27
3	Fenoterol	BECL 1000	60	65,7		7,2	20,5	53	0,22

4	Salbutamol	BUD 1600	24	65,5		163,35	131,2	183,2	1,04
5	Salbutamol	BECL 100	PRN	92,6		955,8	112,2	96,9	0,79
6	Salbutamol	BUD 2400	6	67,4		99,9	225		
7	Salbutamol	BEC 800	8	61,2		38,7	11,6	6,2	
8	Terbutalina	BUD 1200	36	129		916,65	366	463,1	2,71
9	Salbutamol	BUD 800	6	85,1		45,9	42,3	84,2	0,21
10	Salbutamol	BUD 800	24	87,1		378	295	337,1	1,77
11	Terb, Teo	BUD 6400	15	53,8		378	> 635	> 635	
12	Salbutamol			71,6		130,05	76	24,5	
13	Terbutalina	BEC 500	PRN	116		229,95	77,5		
14	Salbutamol			67,2		363,15	113,9		
			Média	83,16	Média geométrica	149,4	85,84	77,99	
			DP	22,4	IC	[67,7, 329,8]	[47,8, 156,9]	[31,57, 192,67]	
						n=14	n=13	n=10	
						NS		NS	
						n=13		n=10	

TABELA 3	EXPERIÊNCIA 3							
	PÓ SECO DE CLORETO DE SÓDIO VIA INALADOR INGELHEIM							
		Esteróides		% FEV1 Pred		Soro fisiológico 4,5%	NaCl #1	NaCl# 2
Nº do Indivíduo	Medicações	Dose	Duração	Pré-teste		PD20	PD20	PD20
		(µg/dia)	(Mês)	Dia de Controlo		(mg)	(mg)	(mg)
1	Salbutamol			100		296,1	73,7	172,1
2	Salbutamol	BECL 400	72	102		32,85	22,1	151
3	Fenoterol	BECL 1000	60	65,7		7,2	50,1	18,2
4	Salbutamol	BUD 1600	24	65,5		163,35	67,2	151
5	Salbutamol	BECL 100	PRN	92,6		955,8	107,7	103,8
6	Salbutamol	BUD 2400	6	67,4		99,9	168,2	138,22
7	Terbutalina	BUD 1200	36	129		916,65	407,2	
8	Salbutamol	BUD 800	6	85,1		45,9	105,6	55,08
9	Salbutamol	BUD 800	24	87,1		378	151,5	56,39
10	Terb, Teo	BUD 6400	15	53,8		378	> 635	> 635
			Média	84,82	Média	152	95,3	86,67

					geométrica			
			DP	22,5	IC 95%	[49,7, 464,7]	[50,6, 179,43]	[50,6, 183,6]
						n = 10	n = 9	n = 8
						NS		NS
						n=9		n=8
						P = 0,096		P = 0,69

RECUPERAÇÃO ESPONTÂNEA
Experiência No 3 cloreto de sódio seco através do Inalador

O valor médio de ±DP para FEV_1 expresso como uma percentagem do valor do pré-ensaio pré-cápsula foi de 88,4% ± 10,6%, 30 minutos após o ensaio e de 94,8% ± 7%,60 mins após o ensaio.

TEMPO & NÚMERO DA CÁPSULAS TOMADAS para o ENSAIO DE CÁPSULA A SECO

Para a Experiência No 2
O tempo médio levado para realizar o ensaio com a cápsula seca de manitol foi de 10,0 ± 3 min e variou desde 6-14 minutos para os 13 indivíduos.

Para a Experiência No 3

O tempo médio (±DP) levado para realizar o ensaio com a cápsula seca de cloreto de sódio foi de 10,6 ± 3 min e variou desde 6-15 minutos excepto no Indivíduo 10 em que foi de 20 min. O número médio de cápsulas foi de 8,6 ± 6,7 para os indivíduos Nos 1-9. O indivíduo 10 precisou de 33 minutos mas não respondeu. Ele estava a tomar 6400µg de Budesonide diariamente.

Taxas de fluxo inspiratório através do Halermatic

As taxas de fluxo inspiratório em todas excepto algumas inalações excederam os 50 L/min. Os fluxos tornaram-se menores à medida que a dose de pó na cápsula aumentou. Deste modo, quando a cápsula vazia estava no Halermatic, o

fluxo mediano foi de 96 L/min e quando as cápsulas de 40 mg foram inaladas foi de 73 L/min.

Taxas de fluxo inspiratório através do Inalador

Estas foram medidas somente uma vez em cada dia do estudo. Em todos os indivíduos, a taxa de fluxo excedeu 43 L/min e o intervalo foi de 43-70 L/min, o valor mediano foi de 57 L/min.

Saturação de oxigénio durante o ensaio:

Um oxímetro de pulso Ohmeda Biox (3700e Louisville, CO EUA) foi usado para medir a saturação de oxigénio arterial. Isto foi realizado como um índice de segurança para garantir que não ocorria hipoxémia grave durante a inalação de manitol. Somente três indivíduos tiveram uma redução na saturação superior a 3% e todos os valores para a saturação permaneceram dentro do intervalo normal ao longo dos ensaios com pós secos.

Indivíduos de Controlo Saudáveis

Foram estudados cinco indivíduos de controlo saudáveis (com idades entre os 19-22 anos), quatro receberam uma dose de 620 mg e um 540 mg. Nenhum destes voluntários saudáveis, que funcionaram como indivíduos controlo, registaram um PD_{20} e a % de queda máxima em FEV_1 foi de 6,5% com a gama sendo de 0-6,5%.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram claramente que tanto o cloreto de sódio como o manitol, administrados a partir de uma cápsula por via de um Halermatic ou do dispositivo Inalador, podem provocar estreitamento das vias aéreas nos mesmos indivíduos asmáticos que são sensíveis à preparação de aerossol húmido de soro fisiológico. Houve um bom intervalo de gravidade da hiperresponsividade da asma conforme demonstrado pelo PD_{20} para o aerossol húmido. Não houve experiências adversas requerendo intervenção médica. O pó de manitol foi extremamente bem tolerado. Alguns indivíduos tiveram dificuldade em inalar o pó do cloreto de sódio, particularmente na dose de 40 mg. Nós estimámos que menos de 30% da dose se depositou no trato respiratório inferior enquanto o restante se depositou no dispositivo e na garganta. Idealmente, uma maior percentagem da dose tem um tamanho de partícula na gama respirável.

As vantagens do ensaio do pó seco sobre o ensaio de aerossol húmido incluem; a maior rapidez do ensaio, a necessidade reduzida de limpar os aparelhos e a natureza potencialmente descartável dos inaladores.

Este é o primeiro dos relatórios jamais feitos sobre os efeitos da inalação de um pó seco de manitol nas vias aéreas de humanos. Este é o primeiro relatório sobre os efeitos de estreitamento das vias aéreas das partículas secas de cloreto de sódio em indivíduos conhecidos como asmáticos.

A única referência à inalação de partículas de cloreto de sódio na gama respirável é como um tratamento para crianças sofrendo de asma brônquica. Tikhomirov, Povlotska, & Zmievskaya (CC Number SU 1581325, Kind A Date 900730 Week

9113 (Basic) da União Soviética relataram que um conjunto de 10-15 inalações diárias de um aerossol de NaCl (contendo 70-80% de partículas de 3 micron com uma densidade de 9-12 mg/metro cúbico) dadas numa câmara com velocidade de ar de 0,1-0,2 m/seg, 40-60 vol de % de humidade relativa a 16-18 graus, por períodos aumentando gradualmente desde 6 até 15 min diminuía a remissão da asma até 1 ano em 61,5% dos casos. A concentração de partículas de pó seco na nossa aplicação é mais alta, sendo tipicamente entre 2,5-10 mg/litro (250-1620 mg/metro cúbico), e a aplicação do nosso estudo é em estreitamento agudo das vias aéreas para fins de diagnostico não para tratamento.

MÉTODOS E RESULTADOS PARA A PROVOCAÇÃO NASAL

Este estudo foi realizado num único indivíduo. O indivíduo estava familiarizado com os métodos e pôde realizar resultados reprodutíveis. O indivíduo activou voluntariamente os seus músculos nasae alar para prevenir o estreitamento nasal das vias aéreas na inspiração, e respirou em volume e taxa corrente normal com um pico de fluxo inspiratório de pelo menos 0,5 L/seg. Os estudos foram realizados numa posição sentada numa sala com ar condicionado ambiente com temperatura ambiente controlada entre 21,5° e 23,5°C e humidade relativa entre 55 e 65%.

A pressão e o fluxo transnasal foram medidos por rinomanometria posterior. O fluxo foi medido usando uma máscara de Sullivan modificada (Rescare, Austrália) ligada a um pneumotaquígrafo Fleish No.2. Um cateter firme cheio com ar foi colocado na parte posterior da língua e selado com os lábios. Isto foi referenciado para a pressão da máscara e foram medidas as variações com o transdutor de

pressão Validyne MP45 (Validyne Corp, Northbridge, CA). Os sinais de pressão e fluxo foram registados a uma taxa de 12 Hertz e foram representados graficamente em simultâneo num ecrã de computador.

Os dados de pressão/fluxo de uma amostra de entre 5 e 7 respirações foram registados. A equação de Rohrer (queda de pressão $=k_1*\text{fluxo} + k_2*\text{fluxo}^2$) foi ajustada aos dados por regressão linear múltipla de mínimos quadrados. A resistência nominal nasal foi então calculada a partir da queda de pressão ajustada a uma taxa de fluxo de 0,5 L/seg na direcção da inspiração. A resistência nasal de linha de base foi a média de pelo menos 4 medições. Uma vez estabelecida a linha de base, os indivíduos submeteram-se ao protocolo do ensaio e a resistência nasal foi medida aos 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, e 20 minutos após o ensaio.

O sal foi administrado na mucosa nasal usando um dispositivo de Spinhaler (Fisons Pharmaceuticals) carregado com metade da dose total. O indivíduo colocou o Spinhaler carregado dentro de uma narina e inalou profundamente. Se a cápsula de sal não ficou vazia após uma inalação, o indivíduo realizou outra até a cápsula estar completamente vazia. O dispositivo foi depois recarregado e foi usada a outra narina.

As Figuras 3 & 4 mostram a resistência nasal em 4 medidas da linha de base antes do ensaio, seguida pelas medidas feitas após o ensaio. A resistência nasal é expressa como cm H_2O/L/seg. Ambas ilustram um aumento na resistência nasal de 1 minuto com uma queda gradual da linha de base acima de 15 minutos. Este padrão é muito semelhante àquele observado com ar frio seco em termos do grau de aumento

assim como no padrão da queda subsequente para a linha de base. A Figura 4 mostra resultados a seguir à inalação de 40 mg, medidos durante 20 minutos de uma dose repetida de 40 mg.

Método para medir depuração mucociliar

A depuração mucociliar é avaliada usando uma técnica de radioaerossol (colóide 99 mTc-enxofre é comummente usado). O radioaerossol deve ser gerado com um nebulizador que produza gotículas que tenham um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de cerca de 6 μm e um desvio padrão geométrico (GSD) abaixo de 2. Um aerossol monodisperso seria ideal. O radioaerossol deve ser administrado com um padrão de respiração controlada para atingir a deposição nas vias aéreas largas ou na condução das vias aéreas. Isto é melhor obtido tendo um alvo, num computador ou numa tela do osciloscópio, que define o volume corrente e os tempos inspiratórios e expiratórios. Os dados experimentais têm mostrado que um volume corrente de 450 mL e uma taxa de pico de fluxo respiratório de cerca de 60 L/min é um bom padrão respiratório para deposição central. A actividade aplicada nos pulmões deve ser cerca de 40 MBq, de modo que o tempo de aplicação deve ser ajustado em concordância. Normalmente, 2 a 3 minutos são suficientes se a actividade de partida no nebulizador é cerca de 1 GBq.

A medida da depuração mucociliar deve começar o mais cedo possível após a libertação do radioaerossol. A melhor forma de medir a depuração mucociliar é usando uma câmara gama. A recolha de imagens de emissão, com uma câmara gama dá boa informação acerca da deposição inicial de radioaerossol em termos de distribuição e intensidade. Imagens em série

anteriores/posteriores, durante cerca de uma hora, fornecem os melhores dados para medir a depuração mucociliar. Uma grande vantagem é que pode ser obtida uma análise regional para a avaliação da depuração mucociliar das vias aéreas grandes e pequenas. A depuração mucociliar segue, normalmente, um padrão bi-exponencial e o ajuste da curva é comummente usado para suavizar os dados. O sal ou o manitol é administrado após a recolha das primeiras imagens que são usadas para avaliar a deposição inicial do radioaerossol.

CONCLUSÃO

Os pós secos das substâncias que têm o potencial para aumentar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas, quando inalados numa dose adequada contendo uma quantidade adequada de partículas respiráveis são adequados para uso no teste de broncoprovocação para identificar pessoas com hiperreactividade das vias aéreas consistente com asma. Estas mesmas substâncias podem também ser inaladas pelo nariz para identificar pessoas com rinite. Estas mesmas substâncias têm o potencial de serem usadas para induzir a expectoração e aumentar a depuração mucociliar.

Lisboa, 9 de Setembro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. O uso de uma substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas num indivíduo cuja substância está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de tamanho respirável, na produção de um agente em pó seco para o diagnóstico de asma e/ou susceptibilidade à asma num indivíduo; em que a substância é seleccionada a partir do grupo que compreende sais minerais, açúcares e açúcares álcoois.

2. O uso de uma substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas de um indivíduo cuja substância está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de tamanho respirável, na produção de um agente em pó seco para aumentar a depuração mucociliar num indivíduo com essa necessidade e/ou para induzir a expectoração num indivíduo com essa necessidade, e em cuja substância é seleccionada a partir do grupo compreendendo sais minerais, açúcares hexoses e pentoses e os seus correspondentes açúcares álcoois.

3. O uso da reivindicação 2, em que o agente em pó seco é para uso no aumento da depuração de secreções das vias aéreas de um indivíduo tendo fibrose quística ou bronquite; ou para uso no tratamento de pneumonia num indivíduo com HIV o qual é suspeito de ter *Pneumocystic Carinii*.

4. O uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 até 3, no qual a substância é

seleccionada a partir do grupo compreendendo sais de sódio ou potássio, açúcares hexoses e pentoses e os seus correspondentes açúcares álcoois.

5. O uso conforme reivindicado na reivindicação 4, no qual a substância é seleccionada a partir do grupo compreendendo cloreto de sódio, cloreto de potássio, manitol e dextrose.

6. O uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 até 5, no qual uma quantidade eficaz das partículas secas tem uma dimensão máxima de sete microns.

7. O uso conforme reivindicado nas reivindicações 1 até 6, no qual a proporção das partículas na gama respirável é de pelo menos 10% em peso da substância, preferencialmente pelo menos 25%, mais preferencialmente pelo menos 40% e o mais preferencialmente pelo menos 50%.

8. O uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 até 7, no qual o agente é para:
   (a) administração nas vias aéreas dos pulmões; ou
   (b) administração nas vias aéreas do nariz.

9. O uso conforme reivindicado na reivindicação 2 em que é induzida a expectoração e analisada para pesquisar tuberculose.

10. O uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 até 9 em que a substância aumenta a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas.

11. O uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 até 10 em que a substância é manitol.

12. Substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas num indivíduo cuja substância está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de tamanho respirável, em que a substância é seleccionada a partir do grupo compreendendo sais minerais, açúcares e açúcares álcoois; para uso no diagnóstico de asma e/ou susceptibilidade à asma num indivíduo.

13. Substância capaz de alterar a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas num indivíduo, cuja substância está na forma de um pó seco dispersável contendo uma proporção eficaz de partículas de tamanho respirável, em que a substância é seleccionada a partir do grupo compreendendo sais minerais, açúcares hexoses e pentoses e, seus correspondentes açúcares álcoois; para uso no aumento da depuração mucociliar num indivíduo com necessidade disso e/ou para induzir expectoração num indivíduo com essa necessidade.

14. A substância da reivindicação 13 em que a referida substância é para uso no aumento da libertação de secreções das vias aéreas de um indivíduo tendo fibrose quística ou bronquite; ou para uso no tratamento de pneumonia num indivíduo com HIV o qual é suspeito de ter Pneumocystic Carinii.

15. A substância para uso conforme reivindicado em qualquer das reivindicações 12 até 14, em que a substância é seleccionada a partir do grupo compreendendo sais de

sódio e potássio, açúcares hexoses e pentoses e seus correspondentes açúcares álcoois.

16. A substância para uso conforme reivindicado na reivindicação 15, em que a substância é seleccionada a partir do grupo compreendendo cloreto de sódio, cloreto de potássio, manitol e dextrose.

17. A substância para uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 12 até 16, na qual a quantidade eficaz de partículas secas tem uma dimensão máxima de sete microns.

18. A substância para uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 12 até 17, na qual a proporção das partículas na gama respirável é de pelo menos 10% em peso da substância, preferencialmente pelo menos 25%, mais preferencialmente pelo menos 40% e o mais preferencialmente pelo menos 50%.

19. A substância para uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 12 até 18, em que o agente é para:
    (a) administração nas vias aéreas dos pulmões; ou
    (b) administração nas vias aéreas do nariz.

20. A substância para uso conforme reivindicado na reivindicação 13 em que a expectoração induzida é analisada para pesquisa de tuberculose.

21. A substância para uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 12 até 20, em que a substância

aumenta a osmolaridade do líquido da superfície das vias aéreas.

22. A substância para uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações 12 até 21 em que a substância é manitol.

Lisboa, 9 de Setembro de 2010

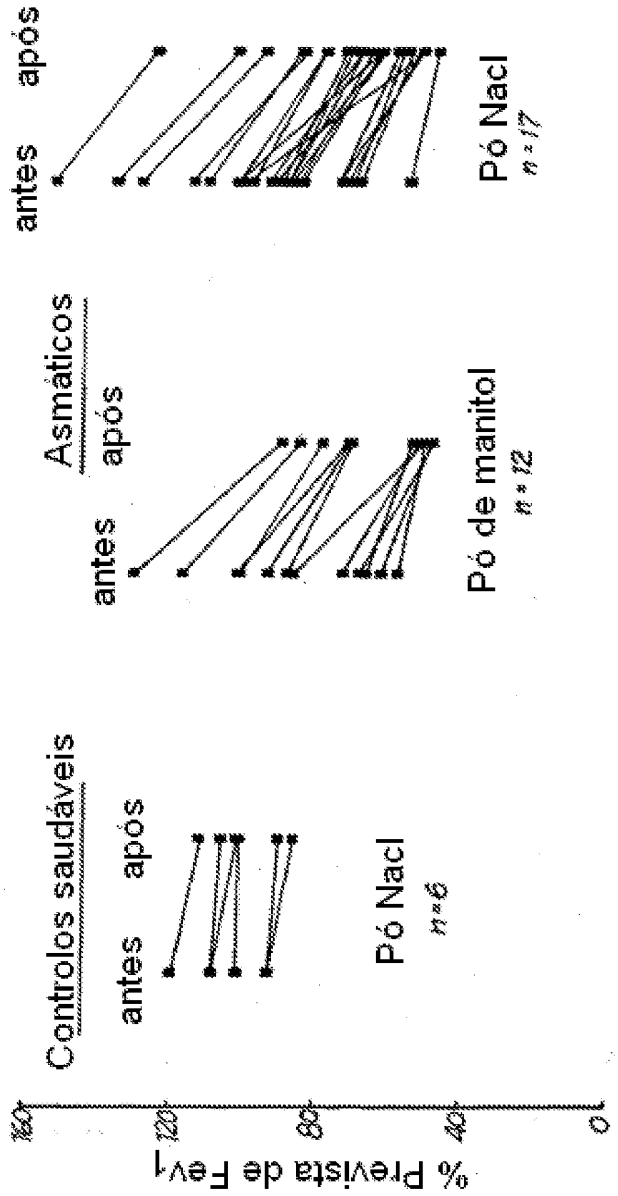

% Prevista de Fev1, antes e após o Ensaio
% Prevista de Fev1
160
120
80
40
0
Controlos saudáveis
antes
após
Pó NaCl
n=6
Asmáticos
antes
após
Pó de manitol
n=12
antes
após
Pó NaCl
n=17

FIG. 1

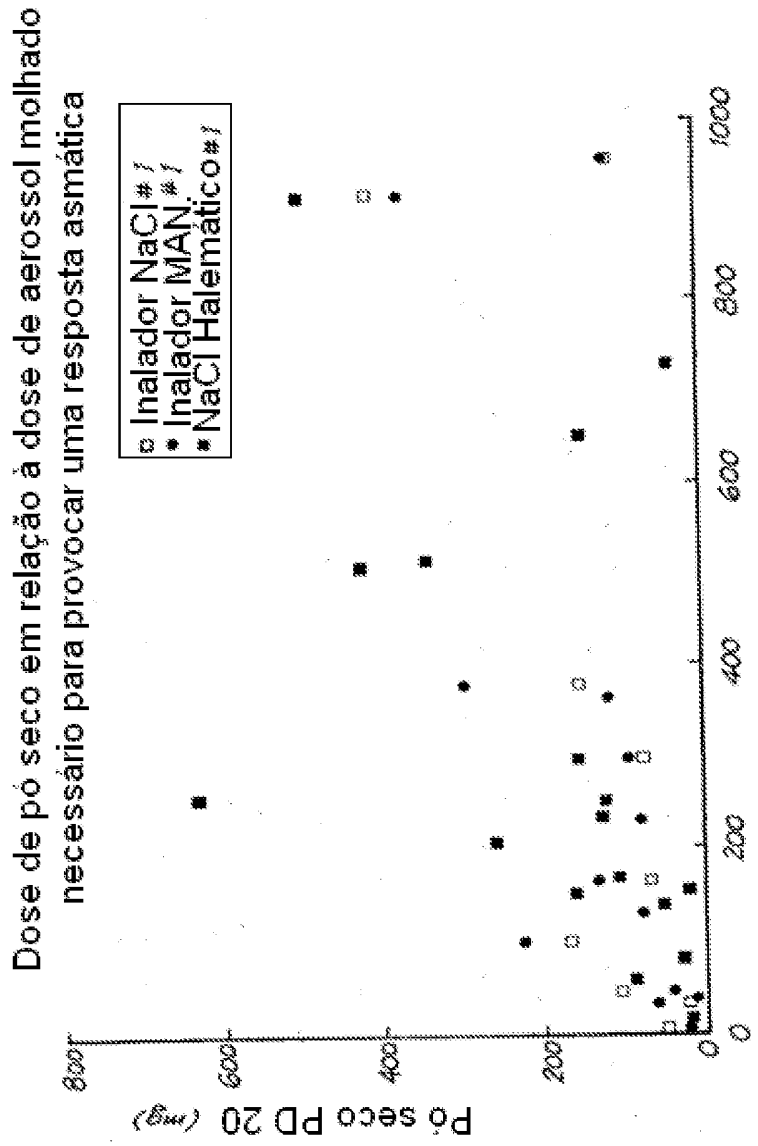

Dose de pó seco em relação à dose de aerossol molhado
necessário para provocar uma resposta asmática
Inalador NaCl # 1
Inalador MAN. # 1
NaCl Halemático # 1
Pó seco PD 20 (mg)
800
600
400
200
0
0
200
400
600
800
1000
Aerossol molhado Pd 20 4,5% soro fisiológico (mg)

FIG. 2

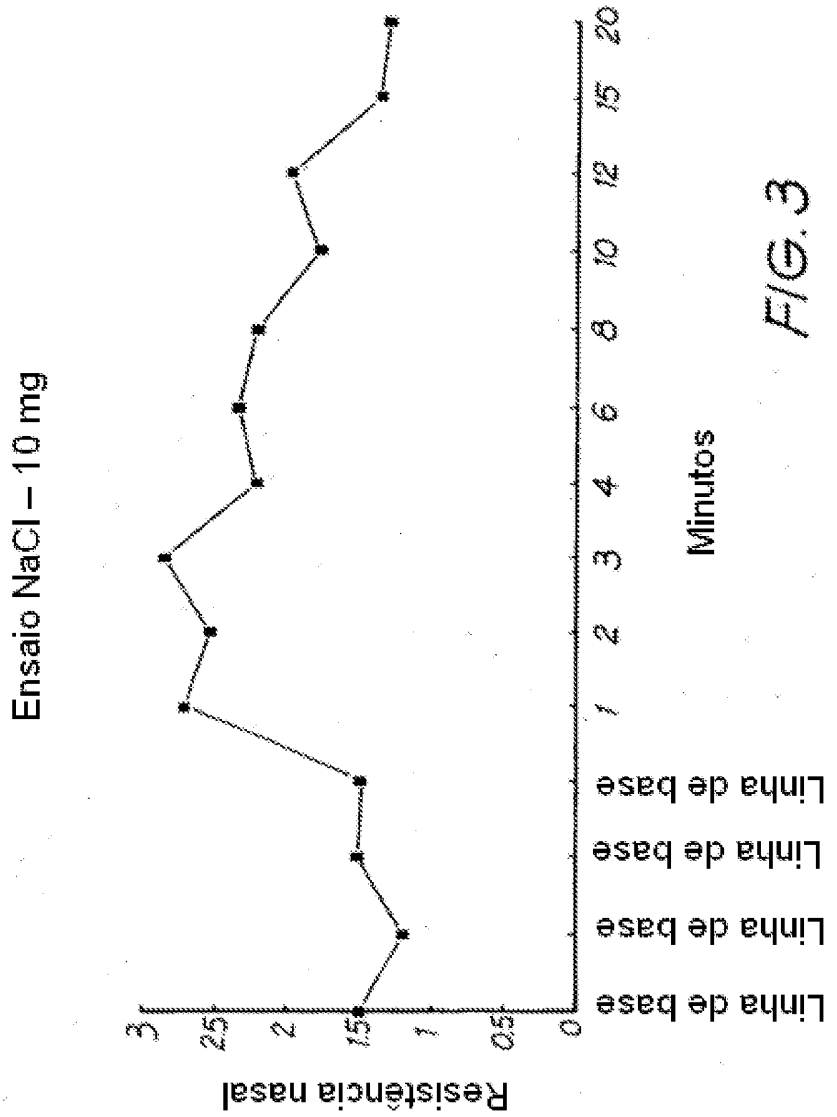

Ensaio NaCl – 10 mg
Resistência nasal
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Linha de base
Linha de base
Linha de base
Linha de base
1
2
3
4
6
8
10
12
15
20
Minutos

FIG. 3

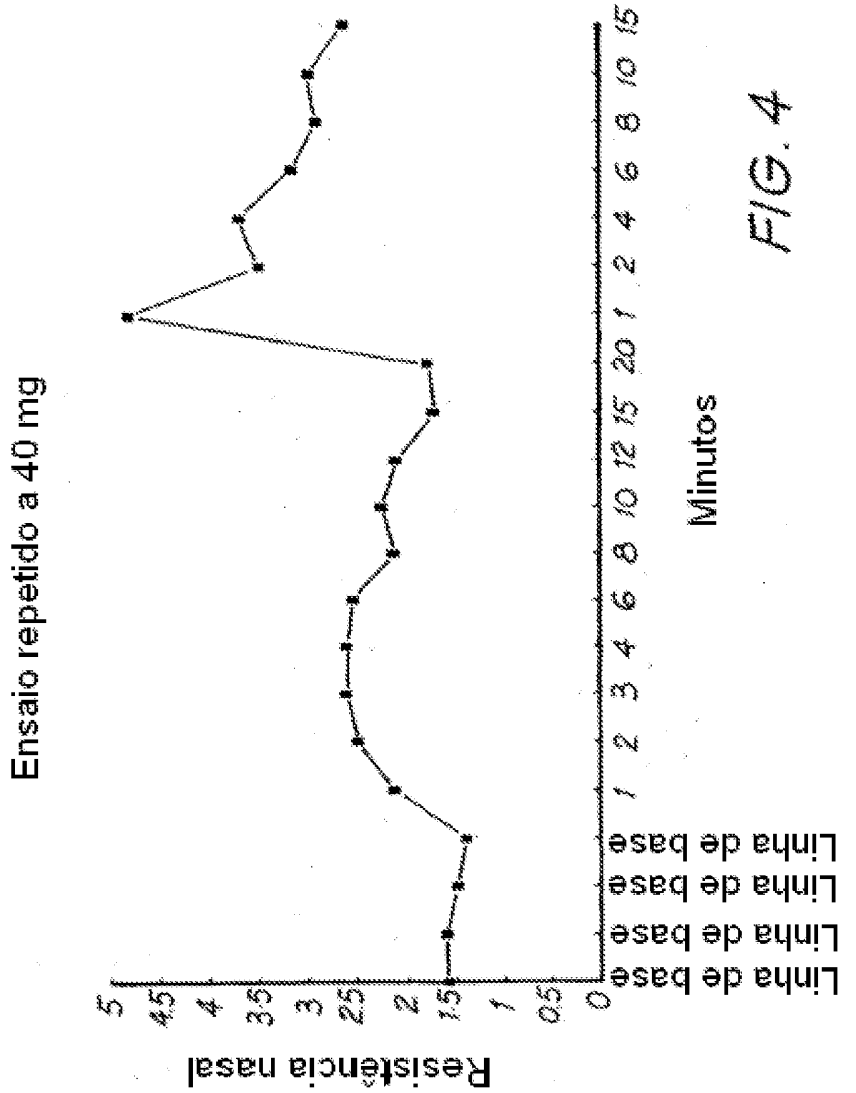

Ensaio repetido a 40 mg
Resistência nasal
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Linha de base
Linha de base
Linha de base
Linha de base
1 2 3 4 6 8 10 12 15 20 1 2 4 6 8 10 15
Minutos

FIG. 4