

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CIPHARMA)

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOPROTETORA DA
PIRIDOSTIGMINA VEICULADA EM LIPOSSOMAS

ALESSANDRA TEIXEIRA VIDAL

OURO PRETO – MG – BRASIL

Maio de 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CIPHARMA)

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOPROTETORA DA
PIRIDOSTIGMINA VEICULADA EM LIPOSSOMAS

ALESSANDRA TEIXEIRA VIDAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Química e Farmacologia de Substâncias
Bioativas

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Andrea Grabe Guimarães
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Neila Márcia Silva Barcellos

Ouro Preto
Escola de Farmácia - UFOP
Maio de 2009

V648a

Vidal, Alessandra Teixeira.

Avaliação da atividade cardioprotetora da piridostigmina veiculada em lipossomas [manuscrito] / Alessandra Teixeira Vidal. – 2009.

148 f.: il. color., tabs., grafs.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães.

Co-orientadora: Profa. Dra. Neilla Márcia Silva Barcelos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

1.Lipossomos - Teses. 2. Eletrocardiograma - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.12-073.7

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

“Pouca ciência torna os homens orgulhosos; muita ciência torna-os humildes. Assim, as espigas vazias elevam a cabeça soberba, enquanto as cheias inclinam-se humildemente para a terra”

Autor desconhecido

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Experimental
da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus, pelo dom da vida, concedendo-me tantas oportunidades e, sobretudo, cercando-me de pessoas tão especiais.

À Nossa Senhora da Luz, por me iluminar e me dar forças para vencer mais esta etapa.

Aos meus pais José Antônio e Carmelita, não só por me apoiarem e compreenderem meus anseios, me incentivando de forma incondicional, mas principalmente por terem julgado prioridade me educar nos termos da ética e honestidade.

Aos meus irmãos, Júnior e Paulo, e a meu sobrinho, João Victor, pelo carinho e alegria que preenchem minha vida.

Aos meus saudosos avós, por seus verdadeiros exemplos de vida e doação, especialmente à doce Vó Olívia, por grande parte do que sou.

Aos meus tios e primos, pela base familiar sólida, onde posso encontrar conforto em todos os momentos.

Ao meu noivo Maurício, pelo carinho, renúncia, paciência e confiança em mim depositada, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Muito obrigada. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas participaram, direta ou indiretamente, na concretização deste trabalho. A todos, os meus mais sinceros agradecimentos. Gostaria, porém, de destacar algumas pessoas que atuaram de maneira especial neste processo.

Primeiramente à Profa. Andrea Grabe, minha orientadora, pela longa caminhada que transcende a cooperação técnica, profissional e científica. Por sua seriedade, serenidade e confiança na condução deste trabalho e, sobretudo, pela agradável convivência e amizade.

À Profa. Neila Barcellos, pela orientação precisa em grande parcela deste trabalho. Agradeço imensamente por toda paciência e humanidade em todos os momentos.

À Profa. Carla Penido, pela disposição em ajudar e orientações na resolução de dificuldades.

Ao Prof. Frezard e seus alunos, pela colaboração no preparo dos lipossomas, disponibilizando seu laboratório na UFMG enquanto não tínhamos condições de preparar as formulações no Laboratório de Farmacologia Experimental.

À Profa. Vanessa Mosqueira, pela disponibilização do Laboratório de Nanotecnologia e às mestrandas Raquel e Liliam pelo auxílio com os equipamentos.

Ao Prof. Homero Guimarães e ao Adriano Cardoso, da UFMG, pelo desenvolvimento do sistema de aquisição de dados e pelo suporte concedido desde o início dos experimentos.

Aos professores do Cipharma, pelos ensinamentos dispensados.

Aos membros da banca, Prof. Romulo Leite e Prof. Pedro Paulo Soares, por sua disponibilidade em contribuir com este trabalho.

À Elaine Leite, pelo incentivo desde a iniciação científica, e por colaborar nas leituras do potencial zeta das amostras.

Aos alunos do Laboratório de Farmacologia Experimental, pelo auxílio precioso nos experimentos e análise dos dados, em especial Dani, Carol, Priscila e Mariana.

Ao Wilson pela dedicação e ajuda no manejo dos animais. E à Priscila, pelo cuidado com os mesmos enquanto aluna de iniciação científica.

Aos colegas de mestrado pela partilha nos diversos momentos de angústia: Lorena, Kemile, Kelly, Milton, Renata e Ricardo.

Às amigas da República Carpe Diem... Jeanne, Mariana, Dani, Ariane e Carol pela ótima convivência e amizade e Ju, Sarah, Paula, Luísa e Natália pela receptividade nos momentos finais do mestrado.

Às amigas Ju e Karina pela agradável companhia nas idas e vindas ouropretanas.

Ao Maurício, meu amor, pela paciência na formatação deste trabalho.

Ao meu irmão Paulo Sérgio, pela contribuição na leitura e correção do texto.

A todas as instituições que possibilitaram a conclusão deste trabalho:

- Capes pela concessão da bolsa de estudos;
- Fapemig pelo suporte financeiro ao projeto (registro CDS 574/04);
- Rede Mineira de Nanotecnologia pelos equipamentos e reagentes;
- UFOP por toda a minha formação acadêmica;
- Cipharma, especialmente à Profa. Dênia Saúde pelo empenho na concretização do curso de pós-graduação.

RESUMO

Com a demonstração dos benefícios da estimulação vagal em pacientes portadores de doenças cardiovasculares, foi sugerido que fármacos colinérgicos poderiam ter efeitos protetores semelhantes. A Piridostigmina, um agente anti-colinesterárico reversível, apresenta benefícios demonstrados em portadores de cardiopatias. No entanto, sua curta meia-vida de eliminação e incidência de efeitos adversos são fatores que podem limitar seu uso prolongado. O desenvolvimento de formas farmacêuticas, como lipossomas de circulação prolongada, podem promover a lenta liberação de fármacos nos tecidos e reduzir sua toxicidade, tendo sido demonstrado seu acúmulo no miocárdio isquêmico. Este trabalho teve por objetivo principal a investigação da atividade cardioprotetora da Piridostigmina veiculada em lipossomas. A preparação dos lipossomas contendo Piridostigmina foi realizada pelo método de congelamento/descongelamento e extrusão. A formulação obtida foi caracterizada e administrada, nas doses 0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg, a ratos Wistar machos, os quais após 1, 2, 4 ou 6 horas foram submetidos à estimulação simpática por administração de 1 ou 3 µg de noradrenalina (NA). Foram obtidos os sinais de pressão arterial (PA) e eletrocardiograma (ECG) dos animais, sendo os parâmetros obtidos comparados aos de animais que receberam solução salina ou Piridostigmina na forma livre. Foi obtida uma eficiência de encapsulação de 15,5% da Piridostigmina nos lipossomas, com vesículas de tamanho médio de 174 nm, índice de polidispersão 0,06 e potencial zeta -50 mV. Nos animais que receberam salina, a NA induziu aumentos significativos de PA sistólica e diastólica, sendo os maiores aumentos observados após a administração de 3 µg de solução (76 e 70%, respectivamente.). Os intervalos PR e QRS do ECG não foram significativamente alterados, enquanto sobre o intervalo QT foram observados aumentos de 22% nos animais que receberam salina, em relação ao período controle. A administração de Piridostigmina nas formas livre e lipossomal não inibiu significativamente os aumentos da PA. Nos animais tratados com Piridostigmina, porém, foi observada redução significativa dos aumentos do intervalo QT decorrentes da estimulação simpática. O efeito máximo da Piridostigmina livre em impedir tais aumentos foi observado após 1 hora da sua administração (6,6% para a dose de 0,3 mg/kg) e não se manteve após 2 horas do tratamento. O efeito máximo da formulação lipossomal em impedir o prolongamento do intervalo QT foi observado 2 horas após o tratamento (8,5% para a dose de 1,0 mg/kg) e foi mantido até 6 horas após sua administração. A administração de Piridostigmina na dose de 1,0 mg/kg na forma livre causou aos animais alterações tóxicas características de hiperestimulação colinérgica, o que não foi observado para a mesma dose na forma lipossomal. Assim, pode-se concluir que a veiculação da Piridostigmina em lipossomas estabilizados estericamente pode ser considerada uma potencial ferramenta terapêutica na prevenção de complicações cardiovasculares decorrentes da hiperatividade simpática em pacientes com doença cardíaca isquêmica.

ABSTRACT

The demonstration of the benefits of vagal stimulation in patients with cardiovascular diseases suggests that cholinergic drugs may have similar protective effects. Pyridostigmine, a reversible anticholinesterase agent, has benefits demonstrated in patients with cardiac failure. However, its short half-life of elimination and the incidence of adverse effects are factors that limit its use. The development of dosage forms such as long-circulating liposome may prolong the release of drugs into tissues and reduce their toxicity, and liposomes accumulation into ischemic myocardium has been demonstrated. The main goal of the present work was to investigate the cardioprotective action of Pyridostigmine encapsulated in long-circulating liposomes. The encapsulation of Pyridostigmine was carried out by freeze-thawed and extrusion. The formulation obtained was characterized and administrated in the doses of 0.1, 0.3 and 1.0 mg/kg to male Wistar rats, which after 1, 2, 4 or 6 hours were submitted to sympathetic stimulation by administration of 1 or 3 μg of noradrenaline (NA). The signals of arterial pressure (AP) and electrocardiogram (ECG) were obtained, and the cardiovascular parameters were compared to the animals that received Pyridostigmine in free form or saline. The encapsulation efficiency of 15,5% of Pyridostigmine into liposomes was obtained, with a medium size of 174 nm, polydispersity index of 0.06 and zeta potential -50 mV. In animals that received saline, the NA induced significant increases in systolic and diastolic AP, with the highest increases observed after administration of 3 μg solution (76 and 70% respectively). The PR and QRS intervals of ECG were not significantly changed, while on the QT interval were observed increases of 22% in animals that received saline, compared to the control period. The administration of Pyridostigmine in free and liposomal forms was not able to inhibit the increases of AP. The animals treated with Pyridostigmine presented a significant reduction of QT interval increases resulting from sympathetic stimulation. The maximum effect of free Pyridostigmine to prevent the QT increases was observed after 1 hour of its administration (6.6% to the dose of 0.3 mg/kg) but it was not maintained after 2 hours of the treatment. The maximum effect of liposomal formulation to prevent the prolongation of the QT interval was observed 2 hours after treatment (8.5% to the dose of 1.0 mg/kg) and this effect was maintained until 6 hours after its administration. The administration of free Pyridostigmine at 1.0 mg/kg caused to the animals toxic effects characteristic of cholinergic hyperstimulation, which was not observed for the same dose of liposomal Pyridostigmine. Thus we can conclude that the encapsulation of Pyridostigmine in long-circulating liposomes may be a potential therapeutic alternative in preventing cardiovascular complications resulting from sympathetic hyperactivity in patients with ischemic cardiac disease.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático do processo de preparação dos lipossomas.	15
Figura 2: Sistema de aquisição dos sinais de ECG e PA.	19
Figura 3: Desenho esquemático do protocolo experimental	20
Figura 4: Traçado normal do ECG	21
Figura 5: Curva padrão da Piridostigmina obtida por espectrofotometria no ultra-violeta	23
Figura 6: Curva padrão de fosfolipídios (DSPC) obtida por espectrofotometria no visível	25
Figura 7: Registro gráfico da análise de tamanho dos lipossomas contendo Piridostigmina	26
Figura 8: Registro gráfico do potencial zeta dos lipossomas contendo Piridostigmina.	27
Figura 9: Exemplo de registro do sinal da PA ao longo do tempo após administração IV de NA.....	29
Figura 10: Parâmetros do ECG em animais antes e após a administração IV de NA.	29
Figura 11: Exemplos de registro da PA ao longo do tempo após administração IV de Piridostigmina livre e lipossomal.	34
Figura 12: Parâmetros do ECG em animais antes e após a administração IV de Piridostigmina livre.	34
Figura 13: Parâmetros do ECG em animais antes e após a administração IV de Piridostigmina lipossomal.	35
Figura 14: Parâmetros do ECG em animais não tratados e tratados com Piridostigmina antes e após a administração IV de NA.	35
Figura 15: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses.	36
Figura 16: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses.	36
Figura 17: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	37
Figura 18: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	37
Figura 19: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses.	38
Figura 20: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses.	38
Figura 21: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	39

Figura 22: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	39
Figura 23: Variação percentual máxima do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, nos diferentes tempos experimentais, após administração IV de Piridostigmina em diferentes doses.	40
Figura 24: Variação percentual máxima do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, nos diferentes tempos experimentais, após administração IV de Piridostigmina em diferentes doses.....	40
Figura 25: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	41
Figura 26: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	41
Figura 27: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	42
Figura 28: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	42
Figura 29: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	43
Figura 30: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	43
Figura 31: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	44
Figura 32: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	44
Figura 33: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	45
Figura 34: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	45
Figura 35: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	46
Figura 36: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	46
Figura 37: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	47
Figura 38: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	47

Figura 39: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	48
Figura 40: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	48
Figura 41: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	49
Figura 42: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	49
Figura 43: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	50
Figura 44: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	50
Figura 45: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	51
Figura 46: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	51
Figura 47: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	52
Figura 48: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	52
Figura 49: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	53
Figura 50: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	53
Figura 51: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	54
Figura 52: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	54
Figura 53: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	55
Figura 54: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	55
Figura 55: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	56
Figura 56: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	56

Figura 57: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	57
Figura 58: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	57
Figura 59: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	58
Figura 60: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	58
Figura 61: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	59
Figura 62: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	59
Figura 63: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	60
Figura 64: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	60
Figura 65: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	61
Figura 66: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	61
Figura 67: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	62
Figura 68: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	62
Figura 69: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	63
Figura 70: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.	63
Figura 71: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	64
Figura 72: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses.	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Doseamento de Piridostigmina em amostras de lipossomas.	23
Tabela 2: Parâmetros indicadores de estabilidade da formulação de lipossomas contendo Piridostigmina no período de 30 dias.	24
Tabela 3: Concentração de DSPC em amostras de lipossomas e relação fármaco/lipídio.	25
Tabela 4: Diâmetro médio e índice de polidispersão da população de lipossomas	25
Tabela 5: Potencial zeta das amostras de lipossomas.	26
Tabela 6: Parâmetros indicadores da liberação da Piridostigmina dos lipossomas a 37°C.	27
Tabela 7: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses	65
Tabela 8: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses.	66
Tabela 9: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses.	67
Tabela 10: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses.	68
Tabela 11: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses.	69
Tabela 12: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses.	70
Tabela 13: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses.	71
Tabela 14: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Pirigostigmina em diferentes doses.	72
Tabela 15: Variações percentuais do intervalo QT do ECG após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	93
Tabela 16: Variações percentuais do intervalo PR do ECG após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	94
Tabela 17: Variações percentuais do complexo QRS do ECG após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	95
Tabela 18: Variações percentuais da pressão arterial sistólica após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	96

Tabela 19: Variações percentuais da pressão arterial diastólica após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	97
Tabela 20: Variações percentuais da frequência cardíaca após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	98
Tabela 21: Variações percentuais do índice QTc após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	99
Tabela 22: Variações percentuais do intervalo QT do ECG após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	100
Tabela 23: Variações percentuais do intervalo PR do ECG após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	101
Tabela 24: Variações percentuais do complexo QRS do ECG após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	102
Tabela 25: Variações percentuais da pressão arterial sistólica após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	103
Tabela 26: Variações percentuais da pressão arterial diastólica após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	104
Tabela 27: Variações percentuais da frequência cardíaca após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	105
Tabela 28: Variações percentuais do índice QTc após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.	106

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AC	Adenililciclase
Ach	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
CHOL	Colesterol
DCV	Doenças cardiovasculares
DSPC	Distearoil-fosfatidilcolina
DSPE	Distearoil-fosfatidiletanolamina
ECG	Eletrocardiograma
EE	Eficiência de encapsulação
FC	Frequência cardíaca
GVS	Lipossomas gigantes
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
ICV	Intracerebroventricular
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
LQTS	Síndrome do intervalo QT longo
LUVs	Lipossomas unilamelares grandes
MLVs	Lipossomas multilamelares
NA	Noradrenalina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PE	Polietileno
PEG	Polietilenoglicol
Pir	Piridostigmina livre
PirLipo	Piridostigmina lipossomal
SCV	Sistema cardiovascular
SNA	Sistema nervoso autônomo
SUVs	Lipossomas unilamelares pequenos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Sistema nervoso autônomo e sistema cardiovascular	4
2.2. Cardioproteção e estimulação colinérgica	6
2.3. Lipossomas	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo Geral	13
3.2. Objetivos Específicos	13
4. METODOLOGIA.....	14
4.1. Preparação dos lipossomas contendo Piridostigmina	14
4.2. Caracterização da preparação de lipossomas.....	15
4.2.1. Determinação da eficiência de encapsulação	15
4.2.2. Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas	16
4.2.3. Determinação da concentração de lipídio dos lipossomas e da relação Pir/lipídio	16
4.2.4. Determinação do tamanho dos lipossomas	17
4.2.5. Determinação da carga superficial dos lipossomas.....	17
4.2.6. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da Piridostigmina a partir dos lipossomas	17
4.3. Animais experimentais	18
4.4. Procedimentos cirúrgicos e obtenção dos sinais cardiovasculares	18
4.5. Ativação farmacológica do sistema nervoso simpático	19
4.5.1. Padronização do modelo	19
4.5.2. Protocolo experimental	19
4.6. Análise dos parâmetros cardiovasculares	20
4.7. Análise estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Caracterização da preparação de lipossomas.....	23
5.1.1. Determinação da eficiência de encapsulação	23
5.1.2. Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas	24
5.1.3. Determinação da concentração de lipídio dos lipossomas e da relação Pir/lipídio	24
5.1.4. Determinação do tamanho dos lipossomas	25
5.1.5. Determinação da carga superficial dos lipossomas.....	26
5.1.6. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da Piridostigmina a partir dos lipossomas.....	27
5.2. Avaliação das alterações dos parâmetros cardiovasculares em ratos Wistar submetidos à ativação simpática.....	28
5.2.1. Padronização do modelo	28
5.2.2. Avaliação das alterações dos parâmetros cardiovasculares em ratos Wistar tratados com Piridostigmina.....	30
12. DISCUSSÃO	73
12.1. Caracterização da preparação de lipossomas.....	73
12.2. Avaliação das alterações dos parâmetros cardiovasculares em ratos Wistar submetidos à ativação simpática.....	75
13. CONCLUSÕES.....	81
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
15. ANEXO	93

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) suplantaram, nos países desenvolvidos, todas as outras causas de mortalidade e, num futuro próximo, o mesmo pode vir a ocorrer em diversos países em desenvolvimento. Tal afirmação faz parte de um amplo estudo da OMS (Organização Mundial de Saúde), elaborado pelos pesquisadores Mackay e Mensah (2004), que aborda a epidemia global da doença cardíaca e acidente vascular cerebral. Estes pesquisadores mostraram que, anualmente, 17,5 milhões de pessoas morrem no mundo em decorrência de DCV, representando 30% das mortes globais. Cerca de 80% destas ocorreram em países de baixa e média renda. Foi estimado que, em 2015, 20 milhões de pessoas terão as DCV como *causa mortis*, destacando-se ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais. Este fenômeno é creditado não só ao aumento da população, mas também ao aumento na expectativa de vida e na taxas de prevalência de fatores de risco clássicos, como hipertensão arterial, tabagismo, dislipidemia, diabetes e obesidade.

Dados do Ministério da Saúde mostraram que as DCV representaram, em 2005, 28% do total de todos os óbitos no Brasil. É importante destacar, ainda, que o Brasil tem a maior taxa de mortalidade por doença cerebrovascular entre os países americanos e que o impacto da mortalidade por doenças cardiovasculares atinge a população economicamente ativa de maneira mais significativa que em países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá e Japão.

Em um estudo recente, Curioni e colaboradores (2009) mostraram que no Brasil, de forma semelhante aos países da América do Norte e muitos países europeus, houve um declínio na mortalidade por doenças do aparelho circulatório, sendo esta diminuição associada a uma melhora nas medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento. Ainda assim, espera-se que no mundo, a cada década, o número de mortes por DCV aumente em 4 milhões de indivíduos (Mackay e Mensah, 2004). Desta maneira, faz-se necessária a constante busca de alternativas não só para o tratamento das patologias cardiovasculares, mas também para a melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Vários estudos têm apontado as anormalidades no sistema nervoso autônomo (SNA) como o principal fator desencadeante de problemas cardíacos como arritmias, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, responsáveis também pela ocorrência de mortes súbitas

(Porter *et al.*, 1990; Francis, 1988; Tai *et al.*, 2002; Hoyer *et al.*, 2008). Este desequilíbrio do SNA é reflexo de dois fatores independentes: aumento na atividade simpática ou redução da atividade parassimpática (Porter *et al.*, 1990; Zipes e Wellens, 1998; Rosenwinkel *et al.*, 2001; Taggart *et al.*, 2003). Dentre as alterações causadas pelo SNA no sistema cardiovascular, sua influência sobre o intervalo QT do eletrocardiograma (ECG) tem particular importância (Ahnve e Vallin, 1991; London *et al.*, 1998; Magnano *et al.*, 2002; Rautaharju *et al.*, 2009). De fato, o prolongamento do intervalo QT é um fator de risco independente para arritmias e morte súbita (Schwartz e Wolf, 1978; Schouten *et al.*, 1991; Alga *et al.*, 1991).

A contribuição da hiperatividade do sistema nervoso simpático na gênese das DCV e o valor terapêutico de sua inibição têm sido amplamente estudados (Hjalmarson, 1999; Pavlovic, 2000; Catelli *et al.*, 2003) e, embora os benefícios da estimulação parassimpática na prevenção de complicações isquêmicas tenham sido definidos (De Ferrari *et al.*, 1993; La Rovere *et al.*, 1994; Casadei *et al.*, 1996; Venkatesh *et al.*, 1996; Pedretti *et al.*, 1995 e 2003), ainda não há opções farmacológicas disponíveis. Neste contexto, o brometo de Piridostigmina, um agente anti-colinesterásico reversível, utilizado para o tratamento da *miastenia gravis*, tem sido avaliado como agente promissor na terapêutica da doença cardíaca isquêmica (Grabe-Guimarães *et al.*, 1999; Sant'anna *et al.*, 2003). Pacientes com isquemia miocárdica induzida por exercício físico (Castro *et al.*, 2004) ou insuficiência cardíaca (IC) (Serra *et al.*, 2009) apresentaram melhora da atividade autonômica após a administração oral de Piridostigmina. No entanto, sua curta meia-vida de eliminação (Kolka e Stephenson, 1990) e a alta incidência de efeitos adversos (Kluwe *et al.*, 1989) são fatores que podem limitar seu uso prolongado. O desenvolvimento de formas farmacêuticas que pudessem prolongar sua vida útil e diminuir seus efeitos indesejáveis seria de grande utilidade terapêutica.

Lipossomas, vesículas nanométricas constituídas de fosfolípidios, possuem a propriedade de veicular substâncias ativas hidrofílicas ou lipofílicas, podendo conferir distribuição corporal diferenciada, maior estabilidade e modificadas interações com células hospedeiras e patogênicas (Blume e Cevic, 1990). Permitem, ainda, o direcionamento a alvos específicos, como células e tecidos, aumento da potência e/ou redução da toxicidade da substância encapsulada (ver Chon e Cullis, 1995; Lasic, 1998). A importância de lipossomas tendo como alvo o sistema cardiovascular foi amplamente revisada por Torchilin (1995). A adição de polímero de polietilenoglicol (PEG) à composição dos lipossomas poderia

prolongar a vida útil destes carreadores (Klibanov *et al.*, 1990; Woodle, 1995 e 1998; Dos Santos *et al.*, 2007) e, além disso, lipossomas PEGlados podem sofrer acúmulo no tecido infartado (Torchilin *et al.*, 1992 e 1996). Assim, poderiam ser úteis para proteger o miocárdio de danos causados por eventos isquêmicos (Verma *et al.*, 2005), na medida em que conferem uma lenta liberação local de fármacos protetores.

Nesse sentido a Piridostigmina, fármaco altamente hidrossolúvel e com promissora atividade cardioprotetora, é um fármaco com elevado potencial para ser veiculado no compartimento aquoso dos lipossomas e, uma vez veiculada, uma lenta liberação poderia levar ao prolongamento de seu tempo de ação, bem como redução de seus efeitos colaterais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Sistema nervoso autônomo e sistema cardiovascular

A interação entre o SNA e SCV (sistema cardiovascular) é complexa e fundamental na manutenção da homeostasia cardiovascular, conferindo equilíbrio e proteção a suas funções. A manutenção da função cardiovascular normal é obtida através da regulação neural sobre o coração, pela integração das atividades do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (Cheryl e Kuo 1999).

Por exercer importante papel na regulação do coração, o SNA está envolvido em muitos dos processos fisiopatológicos cardiovasculares. As conseqüências patológicas da disfunção autonômica cardíaca incluem alterações inflamatórias, isquêmicas, degenerativas, tóxicas e metabólicas, agudas e crônicas, da inervação intrínseca do coração, de estruturas aferentes, eferentes e centrais integrantes dos reflexos cardiovasculares (ver Bolis *et al.*, 2000). Estas alterações estão, por sua vez, intimamente ligadas a várias situações patológicas que envolvem o sistema cardiovascular, tais como arritmias, isquemia, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, morte súbita, hipotensão postural e outros distúrbios cardiovasculares (Porter *et al.*, 1990; Hoyer *et al.*, 2008). O desequilíbrio autonômico envolvido na gênese das DCV está associado ao aumento da atividade simpática e redução do tônus vagal (Porter, 1990 *et al.*; Zipes e Wellens, 1998). Os efeitos excitatórios simpáticos podem ser fatores de instabilidade eletrofisiológica pró-arritmogênica, enquanto os efeitos depressores parassimpáticos conferem relativa estabilidade eletrofisiológica ao coração e constituem-se fatores anti-arritmogênicos (Taggart *et al.*, 2003).

As alterações da atividade simpática são melhor conhecidas e estudadas do que aquelas do ramo parassimpático e constituem as maiores evidências da disfunção autonômica (Graham *et al.*, 2002). O aumento do tônus simpático nas DCV constitui um mecanismo compensatório, envolvendo efeitos inotrópicos e cronotrópicos, para manutenção do débito cardíaco, da pressão arterial e da perfusão dos órgãos em situações onde o aporte sanguíneo é comprometido (Hasking *et al.*, 1986; Eisenhofer *et al.*, 1996). Contudo, a noradrenalina não só exerce um efeito tóxico direto sobre os cardiomiócitos (Mann *et al.*, 1992), como estimula a apoptose miocitária (Communal *et al.*, 1998). O aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina é uma constante em pacientes com hipertensão arterial (Folkow *et al.*, 1983),

insuficiência cardíaca (Hasking *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1988), hipertrofia ventricular esquerda (Schlaich *et al.*, 2003) e aparece como fator preditor de mortalidade cardiovascular e desenvolvimento de síndromes isquêmicas em pacientes com disfunção ventricular esquerda assintomática (Benedict *et al.*, 1996).

Estudos mostraram que a modulação farmacológica da atividade simpática poderia desencadear efeitos protetores ou indutores de isquemia cardíaca: enquanto o agonismo α_2 protege contra a taquicardia ventricular, seu antagonismo aumenta o risco de arritmias (Francis, 1988). A utilidade dos β -bloqueadores na prevenção de eventos cardíacos pós-infarto foi bem estabelecida (Hjalmarson *et al.*, 1997; Pavlovic, 2000) e, de maneira semelhante, fármacos simpatomodulatórios centrais como clonidina e rilmelidina preveniram danos miocárdios decorrentes da estimulação simpática central por glutamato em coelhos (Catelli *et al.*, 2003).

A atividade vagal, contudo, foi sugerida como o maior componente da disfunção cardíaca e pode preceder a ativação simpática no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Pomeranz *et al.*, 1985). Ishise e colaboradores (1998) estudaram a regulação autonômica da função cardíaca em cães acordados com insuficiência cardíaca desencadeada por taquiarritmia e revelaram ativação precoce do sistema parassimpático, com diminuição da contratilidade cardíaca, seguida por um aumento gradual da atividade simpática. Da mesma maneira, em um estudo envolvendo pacientes com isquemia miocárdica espontânea e induzida, Manfrine e colaboradores (2004) mostraram que, nos indivíduos com oclusão arterial induzida, predominavam estímulos vagais, enquanto o tônus simpático era majoritário nos pacientes com isquemia previamente estabelecida.

A acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor do ramo parassimpático do SNA, é sintetizada no citosol do nervo terminal a partir da colina, a qual é acetilada pela colina acetiltransferase. É, então, estocada em vesículas e liberada através de estimulação vagal, atuando sobre receptores pós-sinápticos muscarínicos e pré-ganglionares nicotínicos. Seus efeitos são finalizados após degradação pela acetilcolinesterase (ver Vasegui e Shivkumar, 2006). No miocárdio dos mamíferos estão presentes, predominantemente, receptores muscarínicos do subtipo M_2 . Estudos recentes sugerem que outros subtipos de receptores muscarínicos estão presentes no coração de diferentes espécies de mamíferos, inclusive humanos, incluindo os subtipos M_1 , M_3 , M_4 e M_5 . (Sharma *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1999; Wang

et al., 2001; Krejci e Tucek, 2002). Embora a função dos receptores não M_2 não seja bem estabelecida até o momento, Wang e colaboradores (2007) revisaram as potenciais atividades dos receptores M_3 no controle cardíaco em condições normais e em processos patológicos como insuficiência cardíaca, isquemia miocárdica e arritmias. Tais atividades poderiam incluir regulação da frequência cardíaca e repolarização por ativação das correntes de K^+ , modulação de efeitos inotrópicos, citoproteção contra injúria miocárdica e participação na geração e manutenção de fibrilação atrial.

A ativação dos receptores M_2 medeia efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos, os quais são mais significativos nos átrios que nos ventrículos (ver Caulfield, 1993 e 1998). Uma das razões para estas diferenças entre o miocárdio atrial e ventricular pode ser o fato de que, no coração humano, a inervação parassimpática é muito mais densa nos nós sinoatrial e atrioventricular que no ventrículo esquerdo (Lo'ffelholz e Pappano, 1985). Contudo, a maior razão para essa diferença fundamental pode ser devida ao mecanismo efetor ativado pela Ach no átrio e ventrículo. Em ambos, a ativação dos receptores M_2 é acoplada à proteína G, através da via inibitória G_i/G_0 , e causa inibição da enzima adenililciclase (AC), com conseqüente redução da produção do AMPc mediada por AC e seu alvo, supressão da atividade dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e ativação dos canais de K^+ operados por receptores, sendo o aumento da condutância ao K^+ responsável pelos efeitos cronotrópicos e inotrópicos. Nos tecidos atrial e nodal, porém, a ativação dos receptores M_2 ativa outra proteína G, G_K , o que provoca aumento direto do efluxo de K^+ pela abertura dos canais de K^+ , independente de sistemas de segundo mensageiro (Kurachi, 1995; Caulfield, 1998).

A redução dos mecanismos vagais e o aumento da atividade simpática parece ser, portanto, um mecanismo para preparar o sistema cardiovascular para as rápidas variações na frequência e débito cardíacos que ocorrem durante a doença coronariana, embora as ações da noradrenalina possam agravá-la. Alternativas farmacológicas destinadas a contrapor este desequilíbrio devem ser continuamente desenvolvidas, especialmente no que diz respeito à função parassimpática.

2.2. Cardioproteção e estimulação colinérgica

A cardioproteção inclui todos os mecanismos e meios que contribuem para a

prevenção ou regressão de doença coronariana e de infarto do miocárdio e suas complicações, os quais foram extensamente revistos por Kübler e Haass (1996). Várias medidas do dano cardíaco têm valor preditivo para eventos cardiovasculares e incluem disfunção endotelial, hipertrofia ventricular e disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, cuja presença está associada ao aumento da incidência de eventos cardiovasculares fatais (Devereux *et al.*, 2004; Mancina, 2008). A avaliação da cardioproteção pode ser ainda realizada pela avaliação do traçado eletrocardiográfico, medida da força contrátil ou inotropismo cardíaco, sendo hoje disponíveis vários modelos experimentais destinados a determinar *in vitro* e *in vivo* os mecanismos de cardioproteção (Jovanovic e Jovanovic, 2007).

Alterações no traçado do ECG podem ser indicativas de disfunções cardíacas ventriculares e alternativas que as atenuassem poderiam, assim, implicar em proteção cardíaca. As alterações mais significativas incluem o segmento ST, onda T, e duração do intervalo QT, a qual reflete anormalidades na repolarização ventricular. Anormalidades do segmento ST podem ocorrer com ou sem anormalidades da onda T, sendo o inverso igualmente verdadeiro (Rautaharju *et al.*, 2009). O supra-desnívelamento do segmento ST pode ser indicativo de isquemia aguda ou infarto do miocárdio, enquanto o infra-desnívelamento está associado a hipertrofia cardíaca e toxicidade por fármacos (Wagner *et al.*, 2009). A inversão da onda T, por sua vez, pode ser indício de cardiomiopatia hipertrófica ou hemorragia intracraniana (Rautaharju *et al.*, 2009).

As alterações do intervalo QT constituem a mais importante anormalidade do traçado eletrocardiográfico, devido à associação entre o prolongamento do intervalo QT e arritmias ventriculares potencialmente fatais (Ahne e Vallin, 1991; London *et al.*, 1998; Magnano *et al.*, 2002; Rautaharju, *et al.* 2009). O prolongamento do intervalo QT pode ocorrer em decorrência do uso de drogas, alterações na regulação autonômica cardíaca (Murakawa, 2000) ou alterações congênitas nos genes dos canais de K⁺ (London *et al.*, 1998). Independente da via, o estabelecimento da chamada “Síndrome do QT longo” (LQTS) leva ao desenvolvimento de taquicardia ventricular polimórfica atípica conhecida como *Torsade de pointes* e, em muitos, mas não todos os casos, leva a um risco relativamente elevado de morte cardíaca súbita (Antzelevitch, 2007).

O conceito de cardioproteção foi definido após a observação de que curtos e repetidos períodos de isquemia protegiam o coração de um evento isquêmico duradouro subsequente,

num processo de pré-condicionamento isquêmico (Murry *et al.*, 1986). Com base nos mecanismos celulares que envolvem o pré-condicionamento, várias alternativas terapêuticas contra a doença cardiovascular isquêmica foram avaliadas quanto a mecanismos e meios que poderiam contribuir para a preservação do coração, por reduzir ou mesmo prevenir danos cardíacos (De Ferrari *et al.*, 1992; Garaliene, 2001; Glover *et al.*, 2007; Schmechel *et al.*, 2009).

Um princípio essencial de cardioproteção consiste na manutenção da homeostasia cardíaca em condições de hiperativação simpática e suas conseqüências deletérias. Tal proteção é dada pela modulação dos vários processos fisiológicos de regulação da atividade de catecolaminas e seus receptores (De Ferrari, 1993). Vários estudos relataram que a estimulação vagal, por aumentar as ações cardíacas da Ach, poderia ter utilidade na doença cardíaca isquêmica (Kent *et al.*, 1973; Myers *et al.*, 1974), como por exemplo nas arritmias de reperfusão (Zuanetti *et al.*, 1987), na melhoria da função ventricular esquerda (Henning *et al.*, 1990), na prevenção de morte súbita pós infarto agudo do miocárdio (IAM) (Vanoli *et al.*, 1991), no aumento do fluxo sanguíneo coronariano em pacientes com angina (Zamotrinsky *et al.*, 2000) e na injúria de reperfusão (Katare *et al.*, 2009).

Yao e Gross (1993) sugeriram que o mecanismo pelo qual a Ach protege o miocárdio poderia ser mediado pelos receptores muscarínicos cardíacos e canais de K^+ mitocondriais ATP-dependentes (mitK⁺_{ATP}), mas não através de vias relacionadas à síntese de óxido nítrico. O papel da Ach em ativar os mitK⁺_{ATP} foi recentemente elucidado e envolve a produção de radicais livre de oxigênio (Oldenburg *et al.*, 2002). Kakinuma e colaboradores (2005) mostraram um efeito benéfico adicional da estimulação vagal em condições de isquemia, onde a Ach liberada poderia proteger os cardiomiócitos da hipóxia aguda por induzir ao aumento do fator transcricional HIF-1a, o qual ativa a expressão de vários genes indispensáveis para a sobrevivência celular em condições de oxigênio escasso. Outro efeito benéfico da estimulação vagal seria a modulação dos níveis de noradrenalina durante a isquemia aguda do miocárdio (Kawada *et al.*, 2005). Em 2008, Kakinuma e colaboradores sugeriram que os cardiomiócitos possuem um sistema de síntese de Ach que atua através da estimulação dos receptores muscarínicos decorrente da estimulação vagal, constituindo um sistema amplificador dos efeitos cardioprotetores do ramo parassimpático. A estimulação elétrica vagal poderia, ainda, atenuar as alterações eletrocardiográficas de isquemia do miocárdio em cães, melhorar a função ventricular, induzir efeito cronotrópico negativo e aumentar a estabilidade elétrica do

coração, diminuindo a probabilidade de arritmias (Henning *et al.*, 1990; Del Rio *et al.*, 2008).

Baseado no benefício da estimulação vagal em proteger o coração contra episódios de fibrilação ventricular, alterando favoravelmente a automaticidade cardíaca (Eliakim *et al.*, 1961; Waxman *et al.*, 1988) e a refratariedade *in vivo*, (Schwartz *et al.*, 1977; Martins e Zipes, 1980), foi proposto que fármacos colinérgicos também poderiam atuar como cardioprotetores (De Ferrari *et al.*, 1992). O tratamento de cães com infarto do miocárdio com oxotremorina, um agonista muscarínico, resultou na redução de fibrilação ventricular e melhoria da contratilidade, da mesma maneira que o propranolol, um β -bloqueador (De Ferrari, 1993). A administração de baixas doses de escopolamina por via transdérmica, a pacientes com insuficiência cardíaca leve a moderada aumentou a atividade cardíaca vagal, diminuindo a frequência cardíaca e aumentando a variabilidade do intervalo RR, sem exercer efeitos benéficos na tolerância ao exercício ou na incidência e severidade de arritmias ventriculares (La Rovere *et al.*, 1994; Casadei *et al.*, 1996; Venkatesh *et al.*, 1996). Da mesma maneira, a pirenzepina, um análogo da atropina, por via oral, foi capaz de exercer efeitos vagomiméticos em baixas doses, aumentando a variabilidade da frequência cardíaca, também sem ação durante o exercício e na prevenção de arritmias (Pedretti *et al.*, 1995 e 2003).

Outra maneira de aumentar as ações parassimpáticas da Ach seria impedir sua degradação. Sobre o sistema cardiovascular, o emprego de anti-colinesterásicos aumenta a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica, favorecendo a interação da Ach com os receptores muscarínicos (ver Reis *et al.*, 1998). A parte da molécula da colinesterase onde ocorre a hidrólise da Ach possui dois sítios: o esterásico e o aniônico. O aniônico liga-se ao nitrogênio quaternário da Ach e serve para orientar a ligação éster desse neurotransmissor ao esterásico. As moléculas dos inibidores da colinesterase, como neostigmina, Piridostigmina e carbamatos, formam ésteres carbamínicos no ponto esterásico, impedindo a hidrólise da Ach. A ligação resulta na hidrólise da neostigmina e Piridostigmina sendo esta, portanto, uma inibição enzimática reversível. Os carbamatos exercem inibição irreversível com a colinesterase, sendo frequentes os casos de intoxicação (Goodman e Gilman, 2006).

A Piridostigmina é um fármaco usado em pacientes com *miastenia gravis* por aumentar a concentração de Ach na placa motora, aumentando o tônus e a força muscular. Sua ação cardiovascular é usualmente considerada efeito colateral, uma vez que no tratamento da miastenia o objetivo é causar efeitos colinomiméticos sobre a musculatura esquelética

(Castro *et al.*, 2000). No entanto, trabalhos anteriores em ratos normais e em humanos avaliaram o potencial terapêutico da Piridostigmina como fármaco cardioprotetor (Grabe-Guimarães *et al.*, 1999; Sant'anna, *et al.* 2003).

A Piridostigmina, em humanos sadios, reduz a frequência cardíaca sem deprimir a função cardíaca (Nóbrega *et al.*, 1996; Pontes *et al.*, 1998), inibe os aumentos do duplo produto induzidos por estresse mental (Nóbrega *et al.*, 1999), inibe a resposta cronotrópica ao exercício sem reduzir a capacidade funcional (Serra *et al.*, 1998), diminui a dispersão do intervalo QT do ECG no repouso (Castro *et al.*, 2000) e aumenta a função diastólica do ventrículo esquerdo durante o estresse mental (Sant'anna *et al.*, 2003). Estudos clínicos mostraram que a Piridostigmina causa bradicardia de repouso (Stephenson e Kolka, 1990; Nóbrega *et al.*, 1996), aumenta a variabilidade da frequência cardíaca observada no domínio do tempo e da frequência (Izraeli *et al.*, 1991; Reis *et al.*, 1998), sem exercer efeitos negativos sobre a função sistólica e diastólica (Pontes *et al.*, 1998). Em pacientes com doença coronariana, a administração de Piridostigmina pode diminuir o intervalo QTc em repouso (Castro *et al.*, 2002) e após o exercício (Castro *et al.*, 2006), proteger contra a isquemia miocárdica induzida pelo esforço (Castro *et al.*, 2004), impedir o comprometimento da função miocárdica causada por estresse mental (Nóbrega *et al.*, 2008) e melhorar os perfis autonômicos e hemodinâmicos durante o exercício (Serra *et al.*, 2009).

A administração oral em dose única de brometo de Piridostigmina em ratos foi capaz de atenuar as respostas cardiovasculares excitatórias de maneira dose-dependente. Mais especificamente, as variações de $dp/dt_{máx}$ e do duplo e triplo produtos, ou seja, as variações de contratilidade do miocárdio e consumo de oxigênio pelo mesmo, induzidas pela administração intracerebroventricular (ICV) de glutamato, foram reduzidas (Grabe-Guimarães *et al.*, 1999). Também foi avaliada a eficácia da Piridostigmina em um modelo de isquemia do miocárdio induzida pela inibição aguda da síntese do óxido nítrico em ratos, os quais foram submetidos à estimulação pelo glutamato ICV, resultando em redução de alterações na morfologia do ECG indicativas de isquemia do miocárdio (Grabe-Guimarães, 2000). Globalmente, estes estudos confirmam a hipótese de que a estimulação colinérgica pela administração de Piridostigmina pode se tornar uma opção terapêutica para pacientes com doenças cardiovasculares (Nóbrega e Castro, 2000). No entanto, sua curta meia-vida de eliminação (Kolka e Stephenson, 1990) e a incidência de efeitos adversos (Kluwe *et al.*, 1989) são fatores que podem limitar seu uso prolongado.

2.3. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma bicamada fosfolipídica concêntrica, que encerram no seu interior um determinado volume de solução aquosa. Inicialmente usados como modelos de membranas biológicas (Bangham *et al.*, 1965), têm sido frequentemente utilizados como vetores no transporte e liberação de fármacos, podendo encapsular substâncias hidrofílicas em seu interior, hidrofóbicas em suas bicamadas lipídicas e anfifílicas na interface lipídio/água (Lasic, 1998).

Existe uma variedade de lipossomas no que diz respeito à composição molecular, estrutura e tamanho. Assim, de acordo com a lamelaridade e tamanho, os lipossomas convencionais são classificados em (Gregoriadis, 1993):

- Lipossomas unilamelares pequenos (SUVs): compostos por apenas uma bicamada lipídica, possuem diâmetro entre 20 e 100 nm;

- Lipossomas unilamelares grandes (LUVs): intermediários na escala de tamanho (100 nm a 1 μ m), possuem uma única bicamada fosfolipídica;

- Lipossomas multilamelares (MLVs): a membrana é formada por várias camadas fosfolipídicas concêntricas, com diâmetro desde 400 nm até alguns micrômetros;

- Lipossomas gigantes (GVs): geralmente unilamelares, possuem diâmetro superior a 1 μ m.

O processo de preparação dos lipossomas é crucial para delinear o tipo de estrutura a ser obtida. O desenvolvimento bem sucedido de uma formulação depende de fatores como seleção dos lipídios, natureza da substância a ser encapsulada, método utilizado na incorporação do agente a ser encapsulado e metodologia de obtenção das vesículas. Existem várias metodologias (Hope *et al.*, 1986) para a preparação de lipossomas, que, de modo geral, são compostas por três etapas básicas: 1) diluição dos fosfolipídios em solvente orgânico seguida de evaporação deste para obtenção do filme lipídico; 2) hidratação do filme lipídico em meio aquoso; 3) redução do tamanho da vesícula e/ou do número de camadas, se for o caso.

A encapsulação de substâncias em lipossomas permite sua distribuição corporal diferenciada, podendo demonstrar maior estabilidade, modificadas interações com células hospedeiras e patogênicas (Blume e Cevic, 1990), além de atingir alvos específicos, como células e tecidos, aumentando a potência e/ou reduzindo a toxicidade da substância encapsulada. O tipo lipossomal utilizado para uma determinada finalidade está diretamente relacionado à sua composição e estrutura e, dependendo da forma de administração, pode alcançar diferentes sítios no organismo (Lasic, 1998).

Após administração endovenosa, os lipossomas convencionais são rapidamente removidos da corrente circulatória e intensamente capturados no fígado pelos macrófagos (Frezàrd *et al.*, 2005). A remoção desses lipossomas da corrente circulatória depende do tamanho, carga de superfície e estabilidade. Geralmente, vesículas grandes e carregadas positivamente são fagocitadas mais rapidamente que aquelas com carga negativa (Patel, 1992). A adição de polietilenoglicol (PEG) à superfície lipossomal origina estruturas furtivas, estericamente estabilizadas, as quais escapam do sistema fagocitário devido à redução da opsonização das vesículas pelas proteínas plasmáticas, proporcionando maior tempo de circulação (Klibanov *et al.*, 1990; Woodle, 1995).

Caride e Zaret descreveram, em 1977, o acúmulo espontâneo de lipossomas neutros e carregados positivamente em tecido cardíaco infartado. Experimentos de Palmer e colaboradores (1984) demonstraram que o acúmulo de lipossomas em tecidos com isquemia é um fenômeno geral, que pode ser explicado por menor filtração nestas áreas. Ao estudar o acúmulo de imunolipossomas no tecido infartado de coelho, Torchilin e colaboradores (1992) observaram que lipossomas de circulação prolongada, estabilizados estericamente com PEG, sofrem maior acúmulo no tecido infartado de coelhos em relação aos lipossomas convencionais. A dimensão deste acúmulo dependeria, ainda, do tamanho das vesículas (Torchilin *et al.*, 1996). Estas observações levaram à constatação de que lipossomas podem ser usados para liberação passiva de fármacos em tecidos isquêmicos para fins diagnósticos e terapêuticos, particularmente no infarto do miocárdio (Torchilin, 1995; Verma *et al.*, 2005).

Considerando o exposto, neste trabalho foi veiculada a Piridostigmina, substância hidrofílica, no compartimento aquoso de lipossomas estericamente estabilizados e avaliada sua ação cardioprotetora em condições de hiperatividade do sistema nervoso simpático.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar a ação cardioprotetora da Piridostigmina veiculada em lipossomas.

3.2. Objetivos Específicos:

- 1 Encapsular o brometo de Piridostigmina em lipossomas estabilizados estericamente e realizar sua caracterização físico-química.
- 2 Avaliar a ação cardioprotetora da Piridostigmina veiculada em lipossomas em um modelo de estimulação simpática periférica por administração de noradrenalina.

4. METODOLOGIA

4.1. Preparação dos lipossomas contendo Piridostigmina

Foram preparados lipossomas “rígidos” estericamente estabilizados, compostos pelos lipídios distearoil-fosfatidilcolina (DSPC) (Lipoid GmbH, Alemanha) colesterol (CHOL) (Sigma, EUA), e distearoil-fosfatidiletanolamina acoplado a um polímero de etilenoglicol (DSPE-PEG) (Lipoid GmbH, Alemanha) na relação molar 5:4:0,3 em um total de lipídios de 91 mM.

Os lipossomas foram obtidos através da metodologia de congelamento/descongelamento seguida de extrusão, proposta por Nayar e colaboradores (1989). Os lipídios foram solubilizados em clorofórmio e este evaporado com auxílio de um evaporador rotatório (Laborota4000[®], Heidolph Instruments, Alemanha) a 70 rpm e 60°C por 10 minutos, levando à formação de um fino filme lipídico nas paredes do balão. Após completa remoção do solvente orgânico, o filme lipídico foi hidratado por solução de brometo de Piridostigmina isosmótica em relação ao plasma (37,0 mg/ml - Sigma, EUA) para obtenção de lipossomas multilamelares contendo a substância ativa, ou por solução salina tamponada (PBS - NaCl 0,15 M, fosfato 0,01 M, pH 7,2) para a obtenção de lipossomas “brancos”. As soluções obtidas foram, então, homogeneizadas por 5 minutos em evaporador rotatório e submetidas a 10 ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido e banho a 60°C, o que favorece a encapsulação da substância ativa hidrofílica no compartimento aquoso lipossomal. Em seguida, para obtenção de LUV's com dispersão de tamanho uniforme, a solução de lipossomas foi filtrada sob pressão em extrusora (Lipex Biomembranes, Canadá). Foram realizados dez ciclos de extrusão através de membranas de policarbonato de 25 mm de diâmetro e poros de 0,2 µm, sob pressão de 200 a 300 psi e temperatura controlada a 60°C.

A separação da Piridostigmina encapsulada da não encapsulada nos lipossomas foi realizada mantendo-se a preparação em diálise em tampão fosfato (pH= 7,2) durante 24 horas, utilizando membrana de celulose de 6mm de diâmetro (Sigma, EUA). Pequena fração da preparação antes da diálise foi separada para determinação da eficiência de encapsulação.

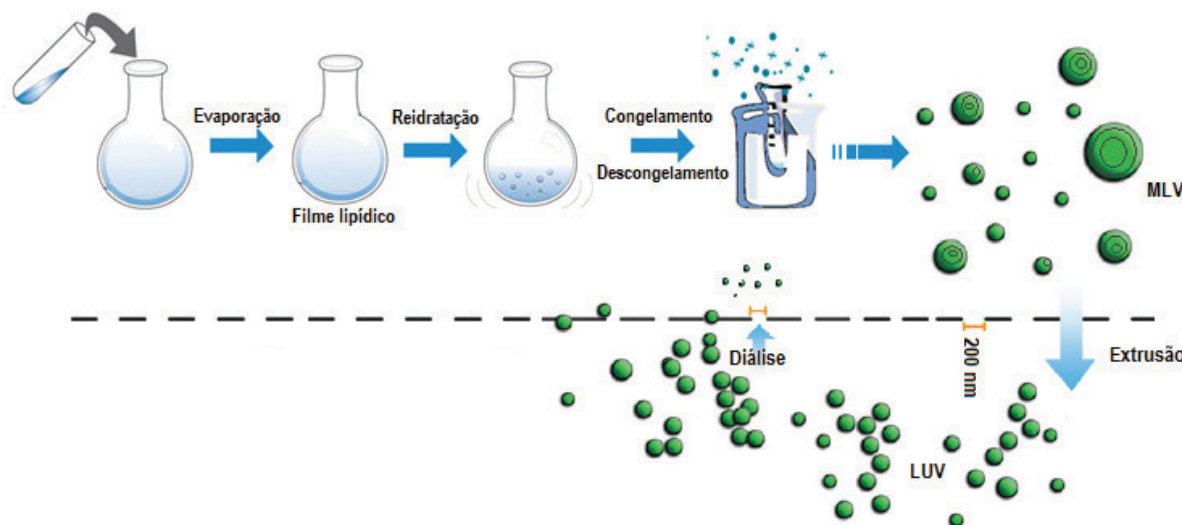


Figura 1: Desenho esquemático do processo de preparação dos lipossomas.

4.2. Caracterização da preparação de lipossomas

4.2.1. Determinação da eficiência de encapsulação

Para a quantificação da Piridostigmina encapsulada nos lipossomas furtivos, amostras foram solubilizadas em metanol, para rompimento da membrana vesicular e sua consequente liberação, e os doseamentos realizados em triplicata por espectrofotometria no ultravioleta no comprimento de onda de 270 nm (Hegazy *et al.*, 2002). As leituras de absorções foram corrigidas pelas leituras de absorção de amostras de lipossomas brancos, utilizando-se como referência uma curva padrão de Piridostigmina, linear no intervalo de concentração entre 0,01 e 0,09 mg/ml (Figura 2).

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada como o teor de Piridostigmina presente na formulação após diálise de 24 horas, em relação ao total encontrado na preparação não submetida à diálise, através da equação:

$$EE_{\%} = \frac{\text{concentração de Piridostigmina nos lipossomas} \times 100}{\text{concentração total de Piridostigmina}}$$

4.2.2. Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas

Com o objetivo de avaliar o percentual de Piridostigmina liberado do interior das vesículas em função do tempo, a formulação lipossomal foi armazenada em geladeira, a 4°C, por 30 dias. Após 7, 14, 21 e 30 dias da preparação, 100 µl da formulação lipossomal contendo Piridostigmina e da preparação de lipossomas brancos foram colocados em ultrafiltros de celulose (Microcon[®] 50,000 MWCO) e centrifugados por 30 minutos a 12000 rpm, de modo a permitir que a fração livre passasse livremente pela membrana de filtração (filtrado) e a fração encapsulada fosse retida (sobrenadante).

Filtrado e sobrenadante foram solubilizados em 5,0 ml de metanol e, em seguida, submetidos ao doseamento por espectrofotometria no ultravioleta (270 nm), sendo os valores obtidos comparados àqueles referentes à preparação inicial, para fim de cálculo do percentual de liberação da Piridostigmina a partir dos lipossomas, através da equação:

$$\text{Liberação}_{\%} = 100 - \left(\frac{\text{concentração de Piridostigmina na preparação armazenada} \times 100}{\text{concentração de Piridostigmina na preparação inicial}} \right)$$

4.2.3. Determinação da concentração de lipídio dos lipossomas e da relação Piridostigmina/lipídio

O teor de fosfolipídios contido nas preparações de lipossomas foi determinado por método colorimétrico proposto por Stewart (1980), onde uma solução de clorofórmio contendo fosfolipídios é misturada ao ferrotiocianato de amônio à temperatura ambiente, sendo formado um complexo colorido que absorve luz visível (comprimento de onda máximo: 488nm).

Uma curva padrão em função de diferentes concentrações de DSPC (lipídio base) foi obtida misturando-se 2 ml de solução de ferrotiocianato de amônio a 2 ml de clorofórmio contendo concentrações crescentes do fosfolipídio. As concentrações de fosfolipídio presentes nas amostras de lipossomas foram determinadas em duplicata, utilizando-se uma curva padrão de DSPC, linear no intervalo de concentração entre 0,03 e 0,15 mg/ml. A relação

Piridostigmina/lipídio foi determinada pela razão entre Piridostigmina presente na preparação lipossomal e o teor de lipídios, em p/p.

4.2.4. Determinação do tamanho dos lipossomas

O tamanho das partículas e índice de polidispersão do tamanho das moléculas da preparação foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando Nanosizer N5 (Beckman Coulter, EUA). As preparações contendo Piridostigmina e salina tamponada foram diluídas na proporção de 1:250 em água Milli-Q® e a distribuição de tamanho e a polidispersão foram avaliadas efetuando-se três leituras para cada amostra.

4.2.5. Determinação do potencial zeta dos lipossomas

O potencial zeta foi determinado pela medida da mobilidade eletroforética, utilizando o Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Reino Unido). As preparações contendo Piridostigmina e salina tamponada foram diluídas na proporção de 1:200 em água Milli-Q® e as leituras efetuadas em triplicata.

4.2.6. Perfil de liberação *in vitro* da Piridostigmina a partir dos lipossomas

A formulação lipossomal de Piridostigmina foi incubada em solução salina tamponada a 37°C e, após 1, 2, 4, 6, e 24 horas, 200 µl da formulação lipossomal contendo Piridostigmina e da preparação de lipossomas brancos foram colocados em ultrafiltros de celulose (Microcon® 50,000 MWCO) e centrifugados por 30 minutos a 12000 rpm, de modo a permitir que a fração livre passasse livremente pela membrana de filtração (filtrado) e a fração encapsulada fosse retida (sobrenadante).

Filtrado e sobrenadante foram solubilizados em 5,0 ml de metanol e, em seguida, submetidos ao doseamento por espectrofotometria no ultravioleta (270 nm), sendo os valores obtidos comparados àqueles referentes à preparação inicial, a fim de determinar o perfil de liberação *in vitro* da Piridostigmina a partir dos lipossomas.

4.3. Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 270 e 320 gramas, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos no biotério da Escola de Farmácia da UFOP até sua utilização, sob ciclo de 12 horas claro/escuro e recebendo água e ração (Socil[®]) *ad libitum*.

4.4. Procedimentos cirúrgicos e obtenção dos sinais cardiovasculares

Os animais receberam pentobarbital sódico na dose de 60 mg/kg, por via intraperitoneal (IP). Após a anestesia ter alcançado a profundidade necessária, os animais foram traqueostomizados utilizando-se um tubo de polietileno (PE) e deixados sob respiração espontânea.

Após tricotomia e assepsia da região inguinal esquerda, foi realizada uma pequena incisão para exposição do feixe femoral. Para obtenção dos sinais da pressão arterial (PA) e para a administração intravenosa (IV) das formulações, foram inseridos catéteres de polietileno na artéria e veia femorais esquerdas, respectivamente. Os catéteres foram confeccionados unindo-se por aquecimento 5,0 cm de tubo de PE10 a 15,0 cm de tubo de PE50, preenchidos com solução salina e ocluídos por agulhas 25x7 cortadas. Após a cateterização, a extremidade PE10 localizava-se na aorta abdominal, abaixo das artérias renais, para registro da pressão arterial, e veia cava inferior, para injeção das formulações.

A extremidade PE50 do cateter inserido na artéria femoral foi acoplada a um transdutor de pressão *TruWave*[®] (Edwards Lifescience, Canadá) para aquisição dos sinais de PA. Para possibilitar a medição da diferença de potencial relativa à derivação DII do eletrocardiograma (ECG), agulhas hipodérmicas de aço inoxidável foram inseridas no tecido subcutâneo dos animais. Os sensores de ECG e transdutor de PA foram acoplados a um sistema condicionador que fornecia sinais em tempo real a uma frequência de 1200 Hz, processados por uma placa conversora analógico-digital (DaqBoard/2001, EUA).



Figura 2: Sistema de aquisição dos sinais de ECG e PA.

4.5. Ativação farmacológica do sistema nervoso simpático

4.5.1. Padronização do modelo

A simulação das condições de hiperatividade do sistema nervoso simpático prevalente nas patologias cardiovasculares foi procedida pela administração intravenosa de noradrenalina (NA). Para determinação de uma dose de NA capaz de induzir aumentos significativos da PA e variação dos parâmetros do ECG em ratos, foram realizados experimentos para triagem e padronização do modelo a ser utilizado nos experimentos. As doses avaliadas foram 1 μg , 3 μg e 10 μg de NA IV *in bolus*.

4.5.2. Protocolo experimental

A atividade cardioprotetora da Piridostigmina foi avaliada pela administração IV de solução de Piridostigmina nas formas livre (Pir) ou encapsulada em lipossomas (PirLipo), seguida de estimulação simpática pela administração de NA nos tempos 1, 2, 4 e 6 horas após a administração de Piridostigmina. Para tanto, as doses utilizadas foram de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg de Piridostigmina, sendo avaliados 6 animais por grupo.

Os experimentos foram realizados nos animais anestesiados de acordo com protocolo experimental abaixo descrito.

1. Procedimento cirúrgico;
2. Dois minutos de registro controle;
3. Injeção IV *in bolus* da solução de Piridostigmina na forma livre ou lipossomal, solução salina ou lipossomas brancos;
4. Tempo de ação da Piridostigmina (1, 2, 4 ou 6 horas);
5. Dois minutos de registro controle;
6. Injeção IV *in bolus* da solução de NA;
7. Dez minutos de registro contínuo após injeção.

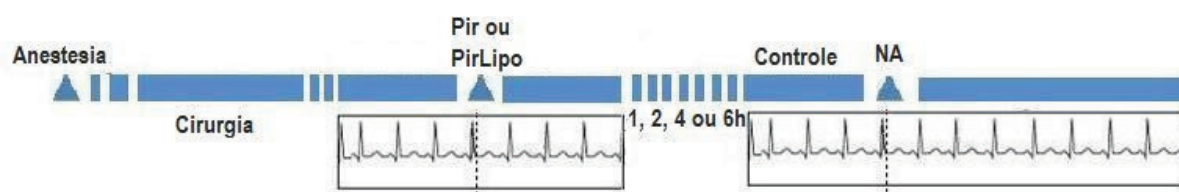


Figura 3: Desenho esquemático do protocolo experimental

4.6. Análise dos parâmetros cardiovasculares

Os registros digitais dos experimentos foram convertidos através do software Matlab 7.0 (MathWorks, EUA) e analisados por inspeção visual com o auxílio do software WinDaq (DATAQ Instruments, EUA). Foram selecionados segmentos em instantes específicos, os quais foram gravados para posterior obtenção dos parâmetros cardiovasculares, sendo 16 segmentos por animal e 3264 segmentos no total.

Foram extraídos os seguintes parâmetros cardiovasculares: pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e intervalos QT, RR, PR e complexo QRS do ECG e correção do intervalo QT pelo índice de Fridericia (1920): $QT_c = QT/(RR)^{1/3}$, os quais são representados na figura 4 abaixo.

Onda P – Primeira onda do ECG normal, corresponde à despolarização atrial, que inicia-se no átrio direito e se estende ao átrio esquerdo.

Intervalo PR – Intervalo de tempo medido entre o início da onda P e o início do complexo QRS, representa o intervalo de tempo compreendido entre o começo da despolarização atrial e ventricular.

Complexo QRS – Compreende as rápidas deflexões produzidas durante a despolarização dos ventrículos. É composto por uma deflexão ascendente, a onda R, a qual é precedida e sucedida por deflexões descendentes - onda Q e onda S, respectivamente.

Onda T – Representa a repolarização ventricular e é normalmente ascendente.

Intervalo QT – Corresponde à sístole elétrica total ventricular, compreendendo o tempo desde a despolarização até a repolarização dos ventrículos direito e esquerdo, respectivamente, e inclui o complexo QRS, o segmento ST e a onda T.

Intervalo RR – Parâmetro determinante da frequência cardíaca, representa o intervalo entre duas ondas R adjacentes.

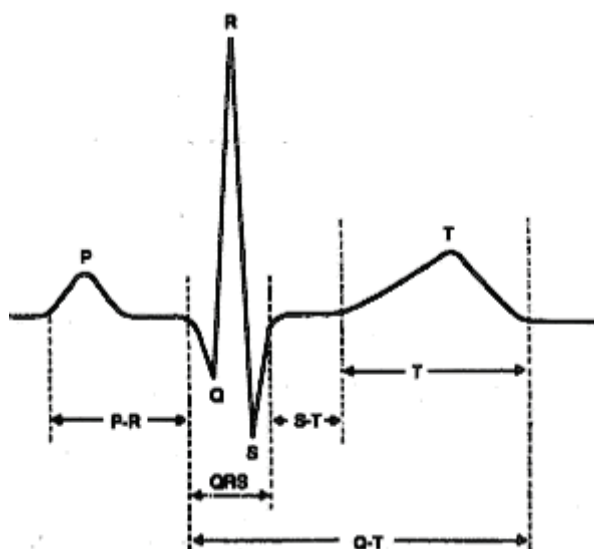


Figura 4: Traçado normal do ECG

Para avaliação dos efeitos da Piridostigmina, as análises dos parâmetros obtidos do ECG e de PA foram realizadas, de acordo com os aspectos observados para o protocolo de estimulação simpática, nos tempos 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 45 segundos e 1; 1,5; 2; 3; 4 e 5 minutos após administração de NA. Para a eliminação de possíveis vícios na análise dos parâmetros do ECG, os seguimentos posteriores à administração de NA foram analisados antes do período controle, pelo mesmo observador em mais de um momento e ainda por um segundo observador.

4.7. Análise estatística

Por atenderem ao teste de normalidade, os parâmetros do ECG e de PA foram analisados por One-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. O software GraphPad Prism[®] 5.0 (GraphPad Software, EUA) foi utilizado como ferramenta para as análises estatísticas. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da preparação de lipossomas

5.1.1. Determinação da eficiência de encapsulação

A tabela 1 apresenta os valores da eficiência de encapsulação da Piridostigmina nos lipossomas após diálise da preparação por 24 horas. As concentrações das amostras foram determinadas por espectrofotometria no UV a partir equação da reta obtida de curva padrão visualizada na figura 5.

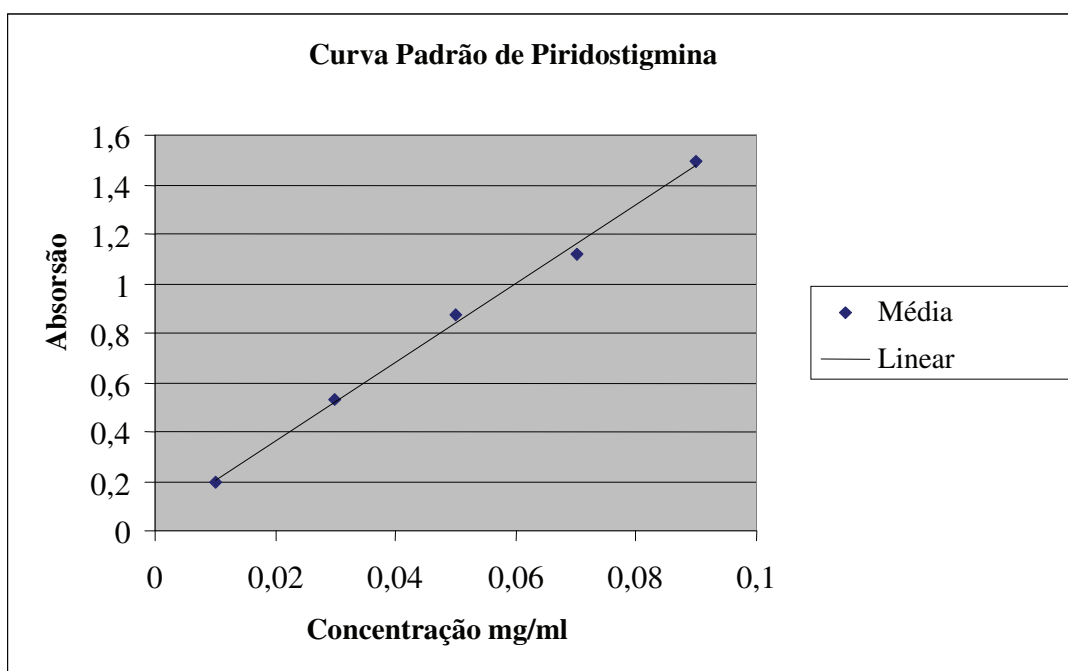


Figura 5: Curva padrão da Piridostigmina obtida por espectrofotometria no ultra-violeta (270nm)

$$y = 0,04561 + 15,94x, r = 0,9983$$

Tabela 1: Doseamento de Piridostigmina em amostras de lipossomas.

Concentração na preparação sem diálise (mg/ml)	Concentração na amostra de lipossomas após diálise (mg/ml)	Eficiência de Encapsulação (%)
35,56 ± 2,43	5,60 ± 0,85	15,48 ± 3,47

5.1.2. Avaliação da estabilidade da formulação de lipossomas

Os valores obtidos na avaliação da estabilidade da formulação de Piridostigmina encapsulada em lipossomas e armazenada em geladeira (4°C) estão apresentados na tabela 2. Nos primeiros sete dias após preparação a formulação apresentou liberação de apenas 4,5% do conteúdo encapsulado. Já após a segunda semana foi observado, em média, 15% de liberação da substância ativa por semana até o período avaliado de 30 dias.

Tabela 2: Parâmetros indicadores de estabilidade da formulação de lipossomas contendo Piridostigmina no período de 30 dias.

Período após preparação (dias)	Concentração (mg/ml)	% Liberação
0	10,28	-
7	9,81	4,53
14	8,52	17,12
21	7,07	31,23
30	5,92	44,89

5.1.3. Determinação da concentração de lipídio dos lipossomas e da relação Piridostigmina/lipídio

A tabela 3 apresenta a concentração de fosfolipídios (DSPC, fosfolipídio base) contido nas preparações de lipossomas e a relação fármaco/lipídio, calculada a partir equação da reta obtida da curva padrão visualizada na figura 6.

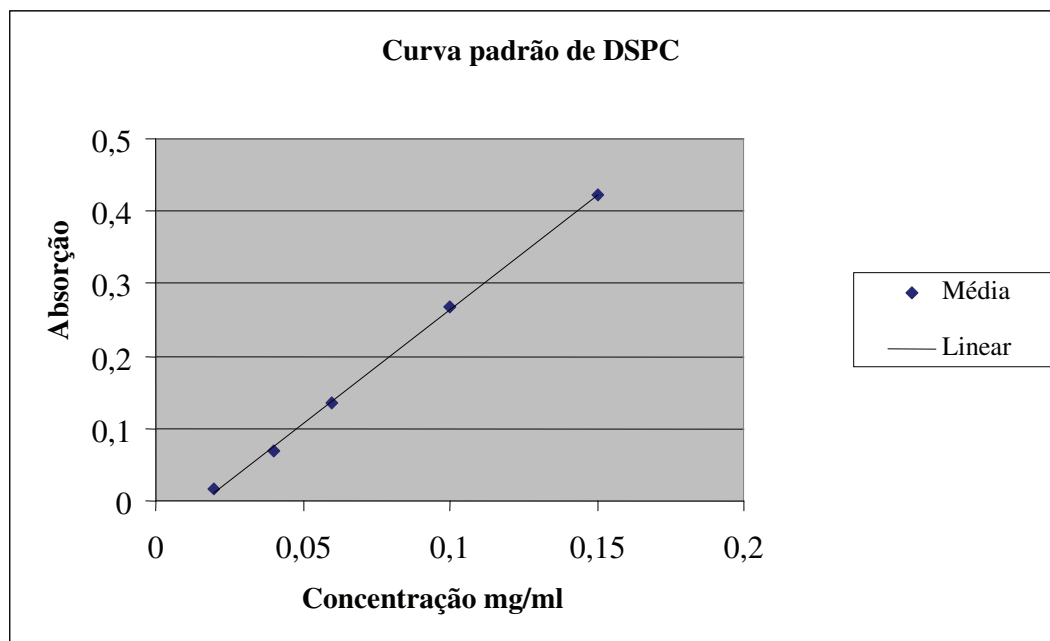


Figura 6: Curva padrão de fosfolipídios (DSPC) obtida por espectrofotometria no visível (470nm)

$$y = 3,1556x - 0,0514, r = 0,9995$$

Tabela 3: Concentração de DSPC em amostras de lipossomas e relação fármaco/lipídio.

	Concentração DSPC mg/ml	Relação Pir/DSPC
Piridostigmina	57,48	0,09
PBS	39,26	-

5.1.4. Determinação do tamanho dos lipossomas

O diâmetro médio das vesículas lipídicas e índice de polidispersão do tamanho da população, determinados por espectroscopia de correlação de fótons, dos lipossomas brancos e contendo Piridostigmina são apresentados na tabela 4. A figura 7 apresenta graficamente os resultados obtidos da análise do tamanho das partículas.

Tabela 4: Diâmetro médio e índice de polidispersão da população de lipossomas

	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão
Piridostigmina	174,3 ± 6,01	0,061 ± 0,0127
PBS	158,5 ± 4,42	0,070 ± 0,0133

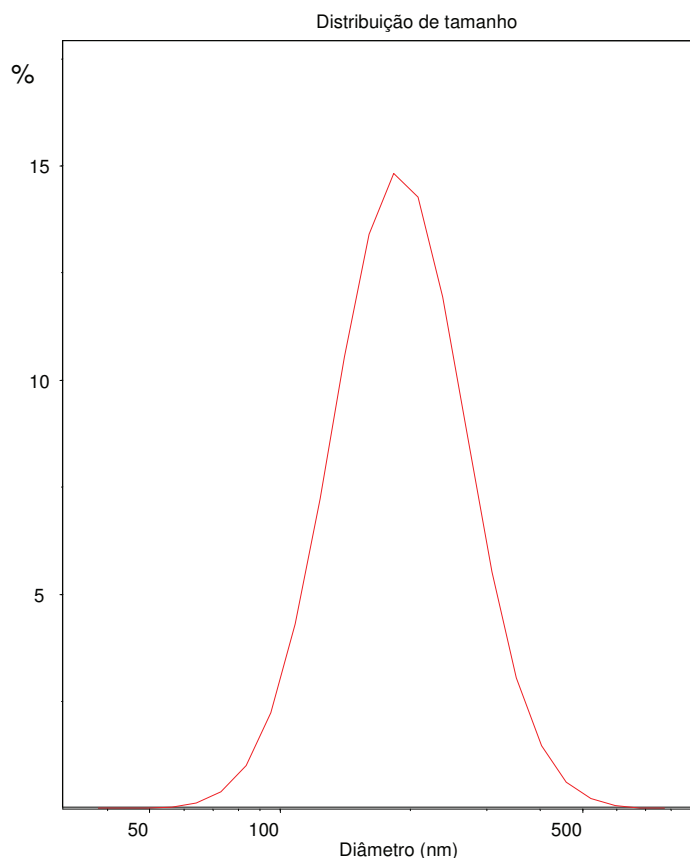


Figura 7: Registro gráfico da análise de tamanho dos lipossomas contendo Piridostigmina

5.1.5. Determinação do potencial zeta dos lipossomas

A tabela 5 apresenta os valores da determinação da carga superficial (potencial zeta) para a preparação de lipossomas contendo Piridostigmina e para a preparação de lipossomas brancos. A figura 8 apresenta graficamente os valores de potencial zeta obtidos.

Tabela 5: Potencial zeta das amostras de lipossomas.

	Potencial Zeta (mV)
Piridostigmina	$-50,6 \pm 2,5$
PBS	$-41,2 \pm 0,9$

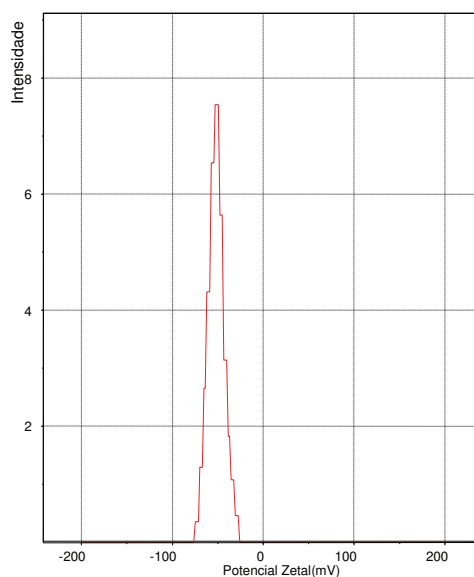


Figura 8: Registro gráfico do potencial zeta dos lipossomas contendo Piridostigmina.

5.1.6. Perfil de liberação *in vitro* da Piridostigmina a partir dos lipossomas

Os valores obtidos na avaliação da liberação *in vitro* da Piridostigmina a partir dos lipossomas incubados a 37°C estão apresentados na tabela 6. Não foi observada liberação da Piridostigmina nas 2 primeiras horas de incubação, sendo observado retenção de mais de 80% da substância ativa após 24 horas de incubação.

Tabela 6: Parâmetros indicadores da liberação da Piridostigmina dos lipossomas a 37°C.

Tempo de incubação (horas)	Concentração (mg/ml)	% Liberação
0	6,72	-
1	6,70	0,37
2	6,70	0,43
4	6,33	5,87
6	6,00	10,78
24	5,01	28,88

5.2. Avaliação das alterações dos parâmetros cardiovasculares em ratos Wistar submetidos à ativação simpática

5.2.1. Padronização do modelo

Para a determinação da dose de NA a ser utilizada no modelo de ativação simpática para a posterior avaliação da potencial atividade protetora da Piridostigmina, foi utilizada inicialmente a dose de 10 µg de NA. Foi observado então, em 8 animais, que esta dose levou à morte 3 animais. Nos animais que não morreram devido à NA, foram observadas alterações dos sinais de ECG e de PA não reversíveis no tempo experimental de 10 minutos.

Foram avaliadas, então, as doses de 1 µg e 3 µg, as quais causaram alterações significativas de PA e ECG que retornavam aos valores basais após o tempo experimental de 5 minutos. Para o parâmetro PA, foram observados aumentos relevantes a partir de 5 segundos após a administração de NA, com um máximo de variação de 55% e 73% após 15 segundos para as doses de 1 e 3 µg, respectivamente, com retorno aos valores basais após cerca de 3 minutos, como mostra a figura 9.

A análise do traçado do ECG mostrou que a administração de 1 µg de NA causou aumento relevante do intervalo QT, com variação máxima de 20% após 20 segundos, sem alterações significativas dos demais parâmetros. Após a administração de 3 µg de NA foi observado, além de prolongamento do intervalo QT (22% após 20 segundos), discreto aumento do intervalo PR e complexo QRS (5% e 6% após 20 segundos, respectivamente) e aumento importante do intervalo RR (figura 10), implicando em uma redução média de 18% na FC após 20 segundos, com retorno aos valores basais após cerca de 3 minutos.

Assim, as doses de 1 µg e 3 µg foram selecionadas para a realização dos experimentos com a Piridostigmina.

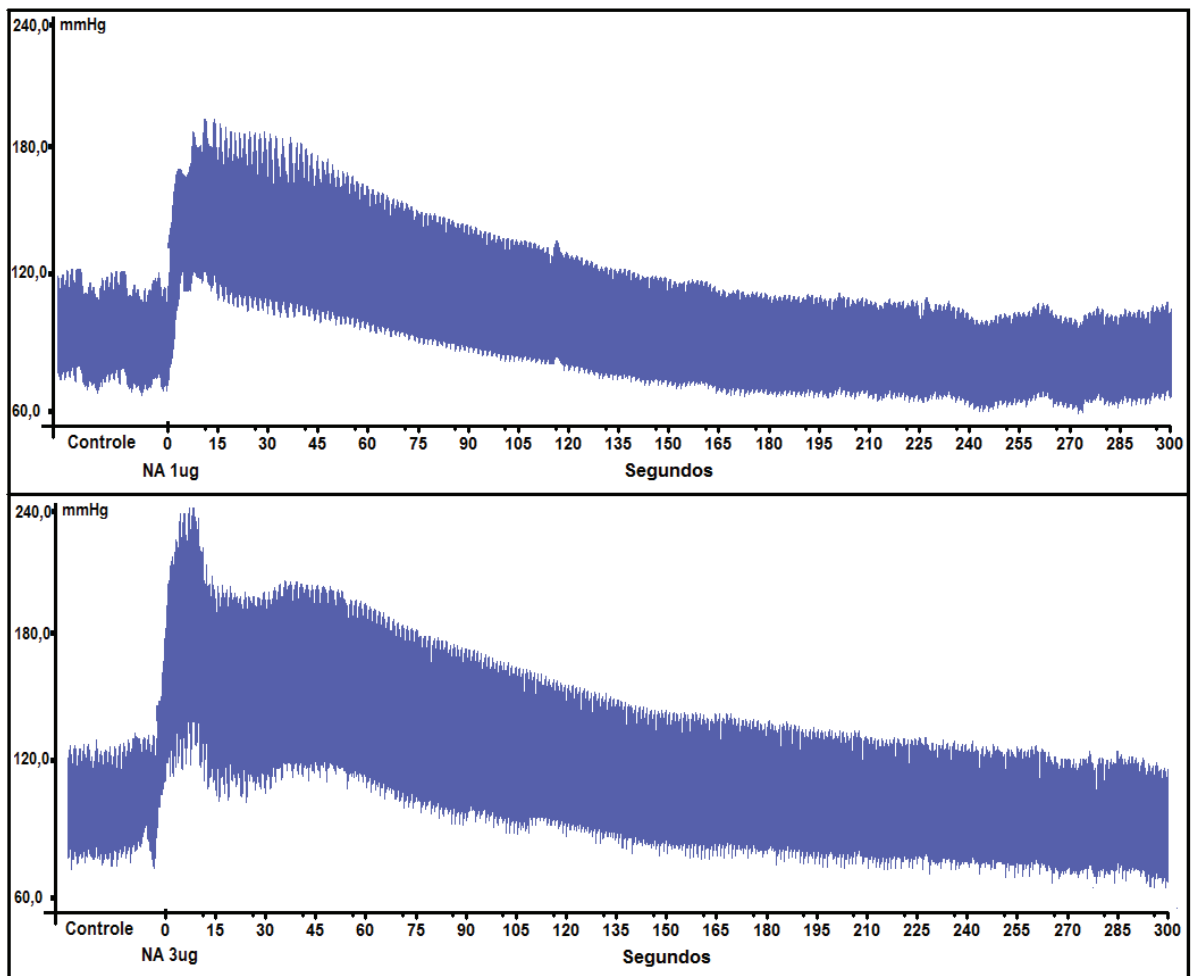


Figura 9: Exemplo de registro do sinal da PA ao longo do tempo após administração IV de NA.

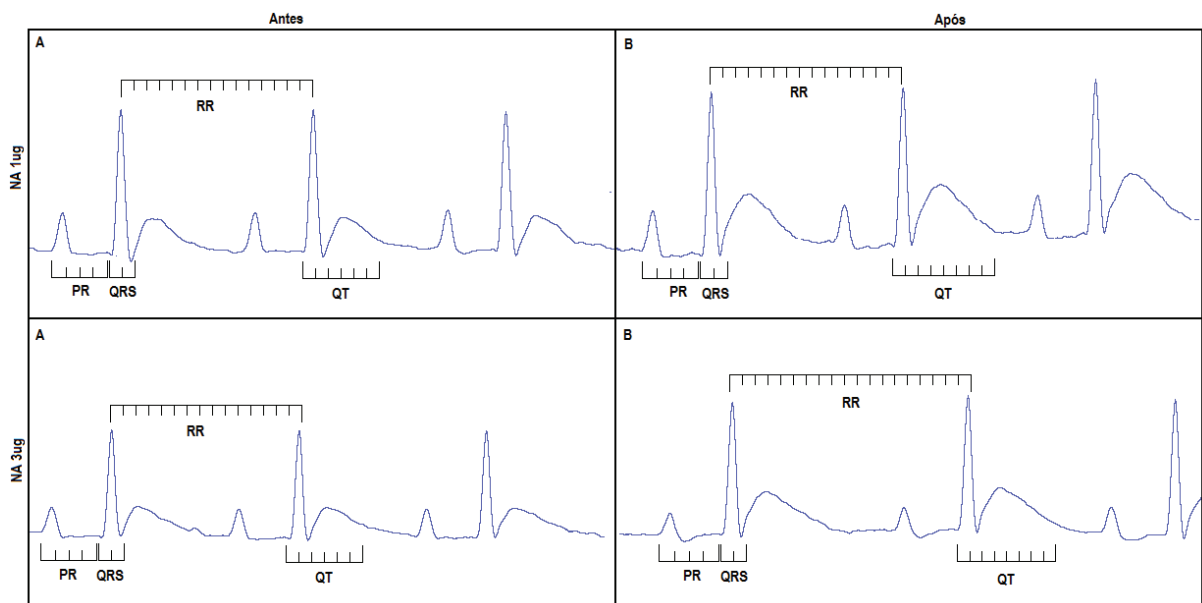


Figura 10: Parâmetros do ECG em animais antes (A) e após (B) a administração IV de NA.

5.2.2. Avaliação das alterações dos parâmetros cardiovasculares em ratos Wistar tratados com Piridostigmina

Para a avaliação da potencial atividade cardioprotetora da Piridostigmina, foram utilizadas as doses 0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg, sendo a primeira dose 100 vezes menor que a utilizada em ratos por via oral – 10 mg/kg, e que apresentou tal atividade (Grabe-Guimarães *et al.*, 1999).

A administração IV de 1,0 mg/kg de solução de Piridostigmina livre causou aos animais alterações tóxicas características de hiperestimulação colinérgica, como piloereção, secreção nasal, aumento da motilidade intestinal, micção, rigidez da cauda e bradicardia severa observada no ECG, sendo descontinuados os experimentos para esta dose. A encapsulação da Piridostigmina foi capaz de reduzir os sinais de toxicidade, uma vez que não foram observados os mesmos efeitos após a administração de 1,0 mg/kg da formulação em lipossomas.

O brometo de Piridostigmina nas doses 0,1 e 0,3 mg/kg para a forma livre e 0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg para a formulação lipossomal, administrado aos animais antes da estimulação simpática com noradrenalina não induziu alterações relevantes de PA (figura 11) e parâmetros do ECG (figuras 12 e 13). O tratamento dos animais com Piridostigmina não alterou os valores absolutos basais da PA e parâmetros do ECG quando comparados ao grupo não tratado, conforme apresentado nas tabelas 7 a 14.

As figuras 15 a 72 apresentam as variações percentuais dos parâmetros do ECG – intervalo QT (15 a 22), intervalo PR, (25 a 32) e complexo QRS (33 a 40) – em animais não tratados (controle) e tratados com Piridostigmina nas formas livre ou lipossomal em diferentes doses e submetidos à ativação simpática. Nas figuras 41 a 56 são apresentadas as variações percentuais da pressão arterial – PAS (41 a 48) e PAD (49 a 56). As figuras 57 a 64 apresentam as variações percentuais da FC e as variações do intervalo QT corrigido pela FC, QTc, são apresentadas nas figuras 65 a 72. As tabelas 7 a 14 apresentam os valores absolutos de todos os parâmetros, para os diferentes tempos experimentais. Os valores das variações percentuais de todos os parâmetros constantes dos gráficos estão apresentados nas tabelas 15 a 28 do anexo.

A administração IV de Piridostigmina foi capaz de reduzir as alterações causadas pela NA sobre o intervalo QT (figura 14). Nos animais que receberam Piridostigmina livre (0,1 e 0,3 mg/kg) 1 hora antes da estimulação simpática com 1 µg de NA, foi observada inibição significativa (variações máximas 8,7 e 6,5 %, respectivamente) das alterações causadas pela NA sobre o intervalo QT. Esses efeitos não foram observados para as três doses (0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg) da formulação em lipossomas no mesmo tempo e mesma dose de NA (figura 15). Para a estimulação simpática pela administração de 3 µg de NA 1 hora após os tratamentos, apenas a formulação livre na dose de 0,3 mg/kg inibiu significativamente o prolongamento do intervalo QT, sendo observado a variação máxima de 6,6 %, (figura 19), o que não foi verificado após a administração da Piridostigmina na menor dose e nem da Piridostigmina em lipossomas. A variação máxima do intervalo QT ocorreu entre 15 e 25 segundos após a administração de ambas as doses de NA.

Os efeitos inibitórios sobre as variações do intervalo QT observados nos grupos tratados com a Piridostigmina na forma livre reduziram no tempo de 2 horas após a administração, razão pela qual tal formulação não foi avaliada nos protocolos com tempos superiores a 2 horas. Por outro lado, 2 horas após o tratamento com a formulação lipossomal contendo Piridostigmina nas doses 0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg foram observadas reduções significativas do prolongamento do intervalo QT induzidas por 1 µg de NA, com variação máxima de 10,1, 7,8 e 8,5 %, respectivamente (figura 16). Após administração de 3 µg de NA, as doses 0,3 e 1,0 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente as variações do intervalo QT, com máximos de variação de 14,8 e 9,7 %, respectivamente (figura 20). Para todos os grupos, as alterações foram máximas entre 15 e 30 segundos após a administração.

A encapsulação da Piridostigmina em lipossomas permitiu o aumento do tempo de sua atividade inibidora do prolongamento do intervalo QT. Os efeitos anteriormente observados com o uso da Piridostigmina sobre o intervalo QT foram mantidos quando os animais foram tratados, 4 horas antes da estimulação simpática, com 0,3 e 1,0 mg/kg para 1 µg de NA ou 1,0 mg/kg para 3 µg de NA (figuras 17 e 21, respectivamente). O tratamento com Piridostigmina 1,0 mg/kg em lipossomas manteve a inibição da ação da NA sobre o intervalo QT até 6 horas após sua administração, apenas quando foi administrada NA 1 µg (figuras 18 e 22). As figuras 23 e 24 destacam os efeitos das diferentes formulações de Piridostigmina em inibir as variações máximas do intervalo QT, as quais ocorreram entre 15 e 30 segundos após

a administração de NA.

A estimulação simpática com 1 μg de NA não levou a alterações relevantes do intervalo PR. Nos animais tratados com Piridostigmina nas formas livres e lipossomal, nos diferentes tempos experimentais, não houve alterações deste padrão de resposta, como pode ser observado nas figuras 25 a 28. A administração de 3 μg de NA levou a um discreto prolongamento do intervalo PR - cerca de 6% em relação ao período controle - nos 30 primeiros segundos. O tratamento prévio com Piridostigmina nas formas livres e lipossomal, para todas as doses e tempos experimentais, foi capaz de inibir significativamente tal alteração, como mostrado nas figuras 29 a 32.

Não foram observadas diferenças significativas do complexo QRS entre os animais não tratados e submetidos à estimulação simpática com ambas as doses de NA e tratados com Piridostigmina nas formas livres e lipossomal, nos diferentes tempos experimentais, conforme figuras 33 a 36 e 37 a 40, para as doses de 1 e 3 μg de NA, respectivamente.

A NA induziu aumentos marcantes de PA. Para a PAS (figuras 41 a 48), foram observados aumentos máximos de 55 e 76% após 15 segundos da administração de NA 1 μg e 3 μg , respectivamente. O tratamento prévio com Piridostigmina 0,3 mg/kg na forma livre, 1 hora antes da estimulação simpática, foi capaz de impedir significativamente o aumento causado por 1 μg de NA, com variação máxima de 26% (figura 41). Apesar dessa mesma dose não inibir significativamente o aumento causado por 3 μg de NA, foi observada redução de cerca de 36% na variação máxima da PAS (figura 45). Para os outros tempos e doses, não foram observadas diferenças significativas entre os animais não tratados e tratados com Piridostigmina. As variações máximas causadas pelas doses de 1 μg e 3 μg de NA sobre a PAD dos animais não tratados foi 56 e 70%, respectivamente, e o tratamento com Piridostigmina livre e lipossomal, nas diferentes doses e tempos de tratamento, não foi capaz de alterar significativamente tais variações, conforme apresentados nas figuras 49 a 56.

A administração de NA 1 μg não alterou significativamente a FC dos animais do grupo controle, sendo o mesmo observado nos animais tratados com Piridostigmina livre e em lipossomas, para todas as doses e tempos experimentais, conforme figuras 57 a 60. A administração de NA na dose de 3 μg , contudo, levou a queda expressiva de FC, com uma diminuição máxima de 18% em relação aos valores basais no grupo controle. O tratamento

com Piridostigmina livre e lipossomal nas diferentes doses e tempos experimentais, não foi capaz de atenuar significativamente tal efeito (figuras 61 a 64).

Nos animais submetidos à estimulação simpática com 1 µg de NA, como não foram observadas alterações relevantes na FC, o índice QTc apresentou perfil de variação semelhante ao do intervalo QT. Assim, foram observadas diminuições significativas nas variações de QTc causadas pela NA 1 µg quando os animais foram tratados com Piridostigmina livre nas doses 0,1 e 0,3 mg/kg 1 hora antes da estimulação simpática (figura 65). Para as formulações lipossomais, foram observadas diferenças significativas a partir de 2 horas do tratamento com as doses 0,3 e 1,0 mg/kg, sendo estes efeitos verificados até 6 horas após o tratamento para a dose de 1,0 mg/kg (figuras 66 a 68). A queda expressiva na FC causada pela NA 3 µg influenciou o perfil de variação do índice QTc para todos os protocolos de tratamento. Assim, não foram observadas diferenças significativas para este parâmetro entre os grupos não tratados e tratados com Piridostigmina devido à bradicardia reflexa induzida pela NA (figuras 69 a 72).

A fim de verificar a influência da composição lipídica dos lipossomas sobre os parâmetros analisados, foi realizada a administração IV de lipossomas a animais, os quais foram submetidos à estimulação simpática pela administração de NA 1 µg e 3 µg 1 e 2 horas após o tratamento. Não foram observadas diferenças entre os parâmetros do ECG e PA entre estes animais e aqueles tratados com salina (grupo controle – dados não mostrados).

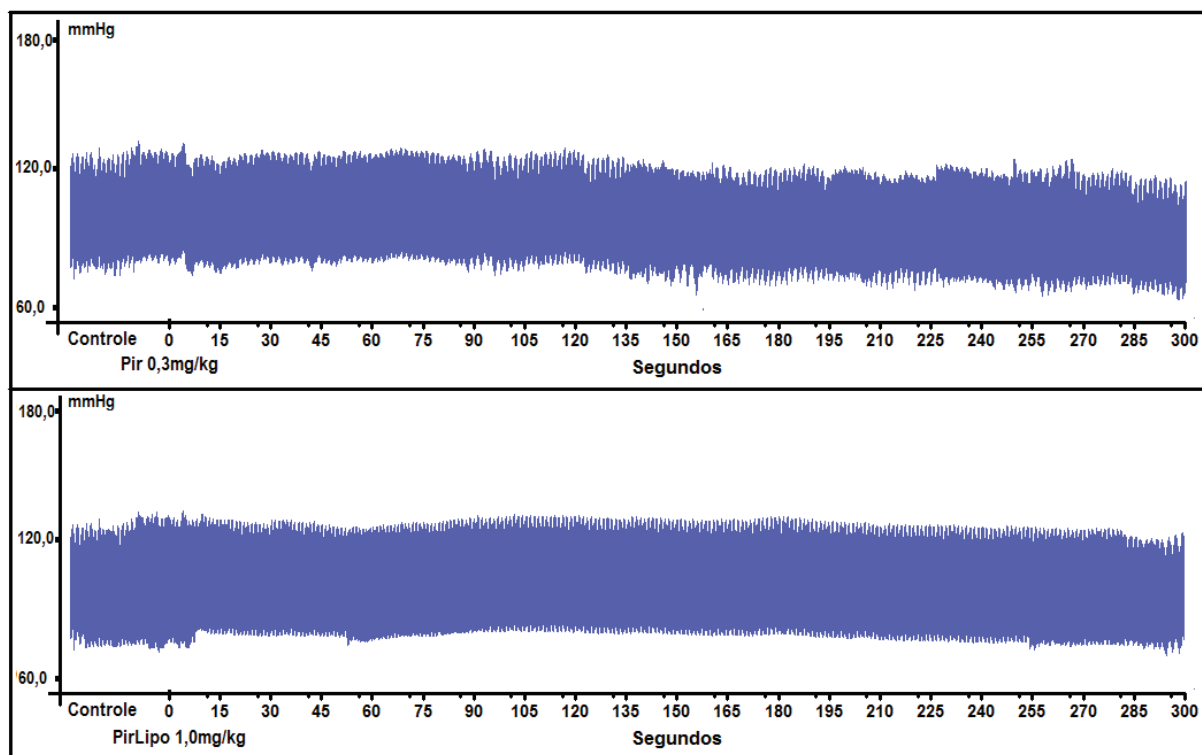


Figura 11: Exemplos de registro da PA ao longo do tempo após administração IV de Piridostigmina livre e lipossomal.

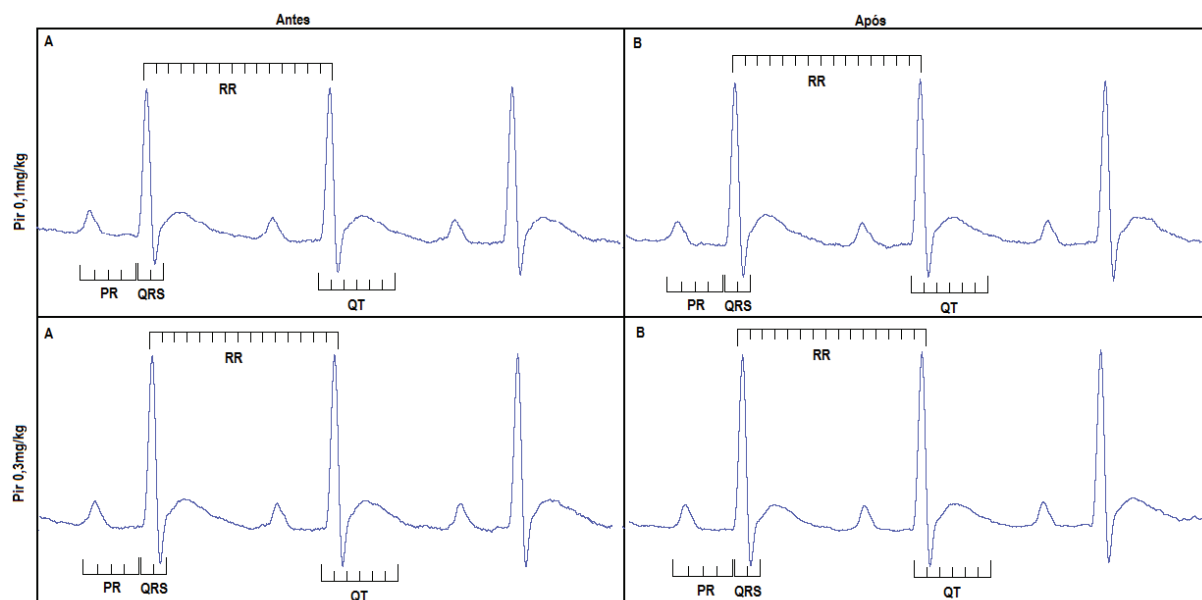


Figura 12: Parâmetros do ECG em animais antes (A) e após (B) a administração IV de Piridostigmina livre.

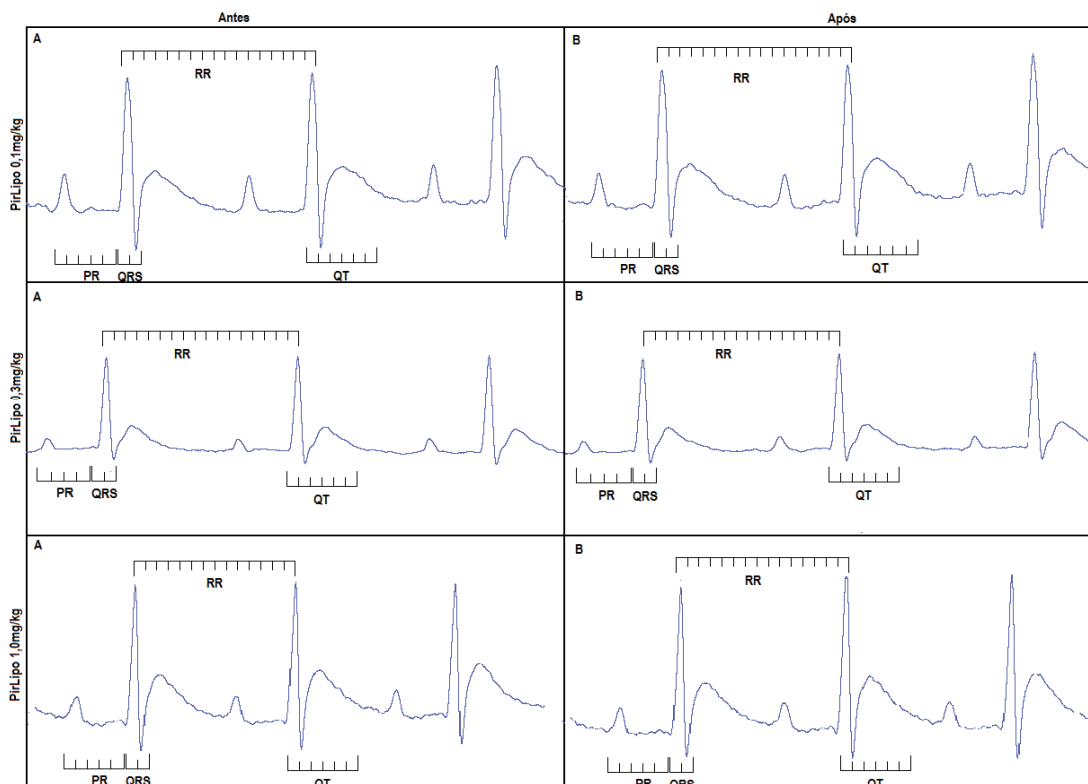


Figura 13: Parâmetros do ECG em animais antes (A) e após (B) a administração IV de Piridostigmina lipossomal.

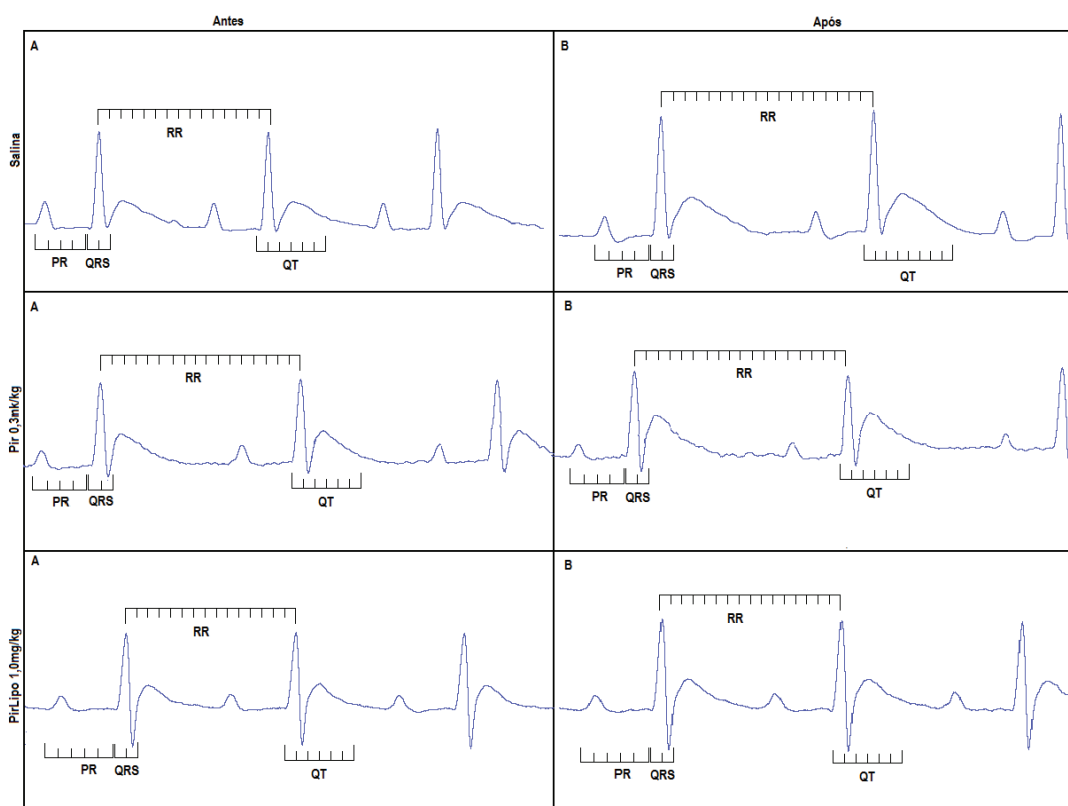


Figura 14: Parâmetros do ECG em animais não tratados e tratados com Piridostigmina antes (A) e após (B) a administração IV de NA 3 µg.

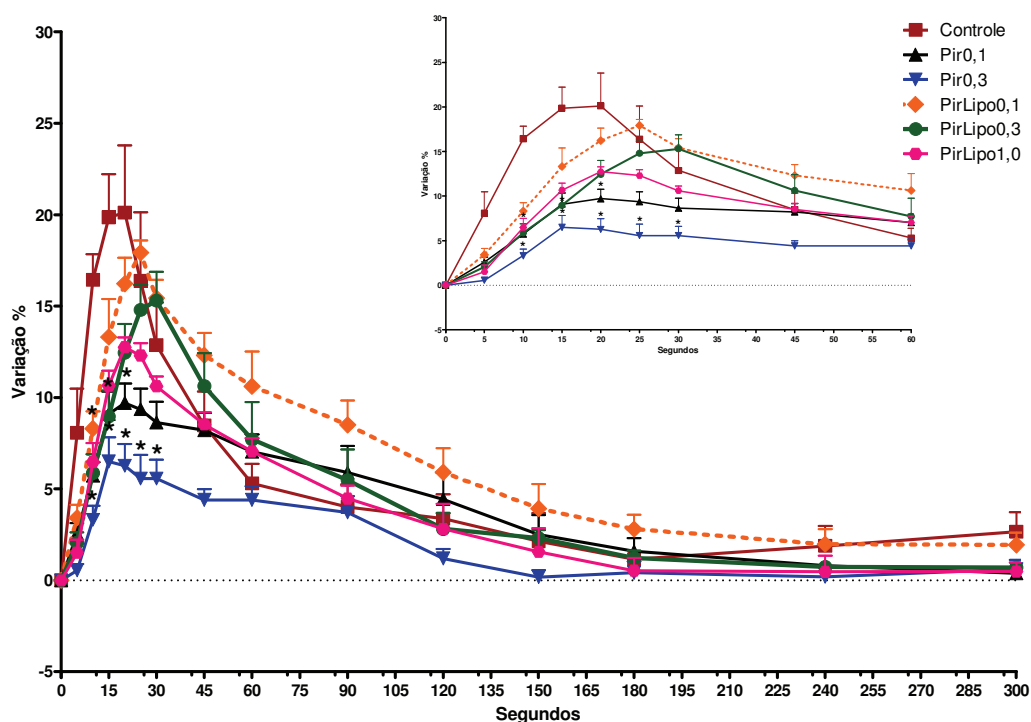


Figura 15: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * P < 0,05 – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

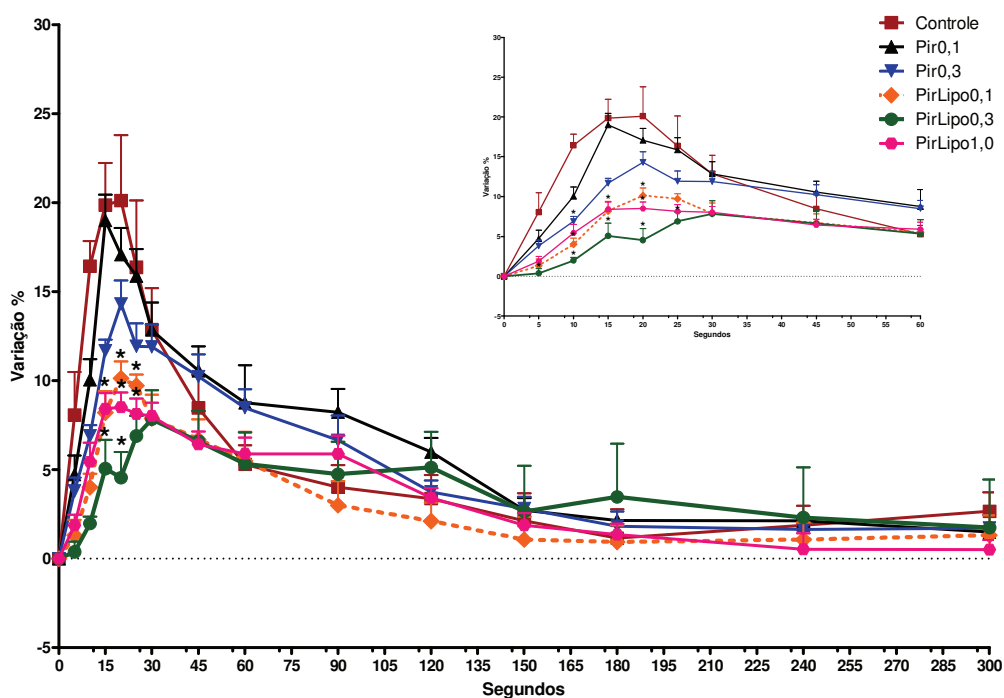


Figura 16: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * P < 0,05 – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

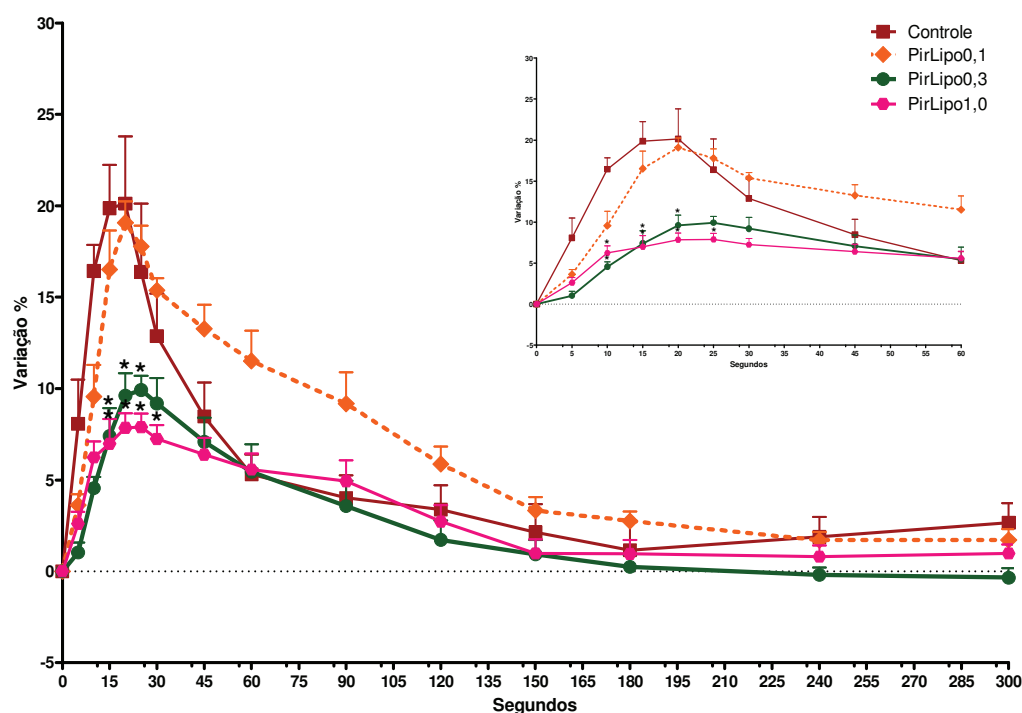


Figura 17: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * P < 0,05 – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

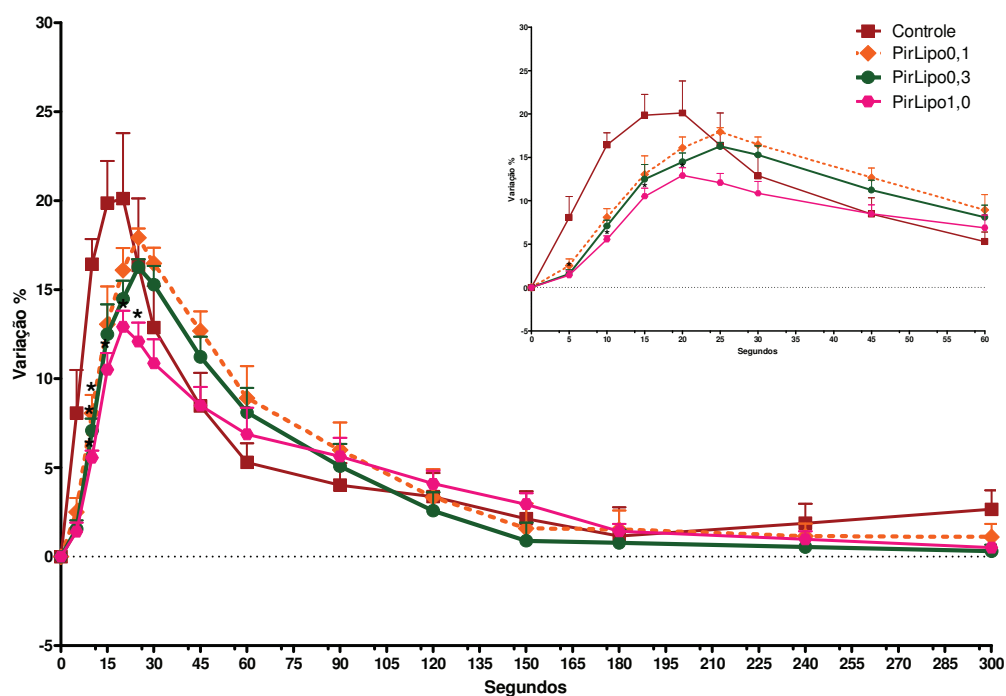


Figura 18: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * P < 0,05 – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

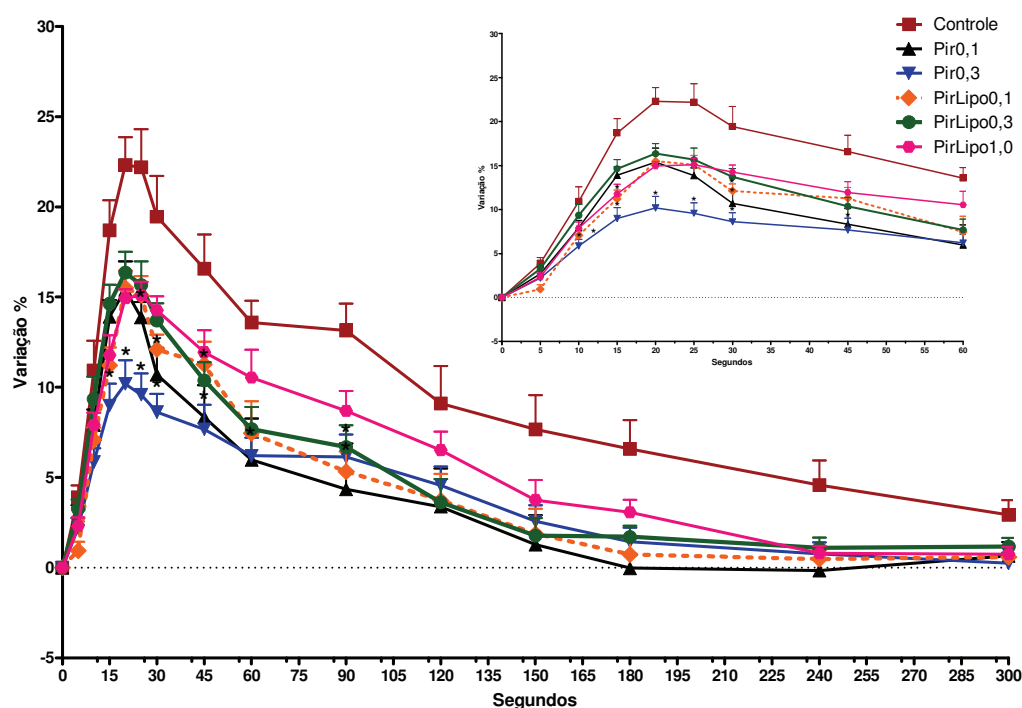


Figura 19: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

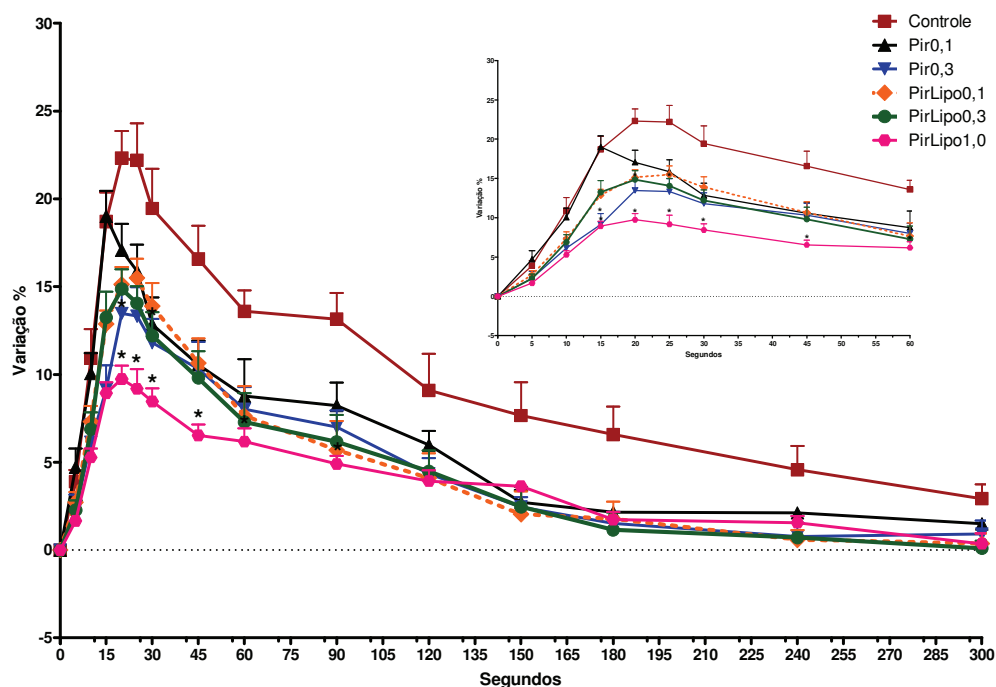


Figura 20: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração IV de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

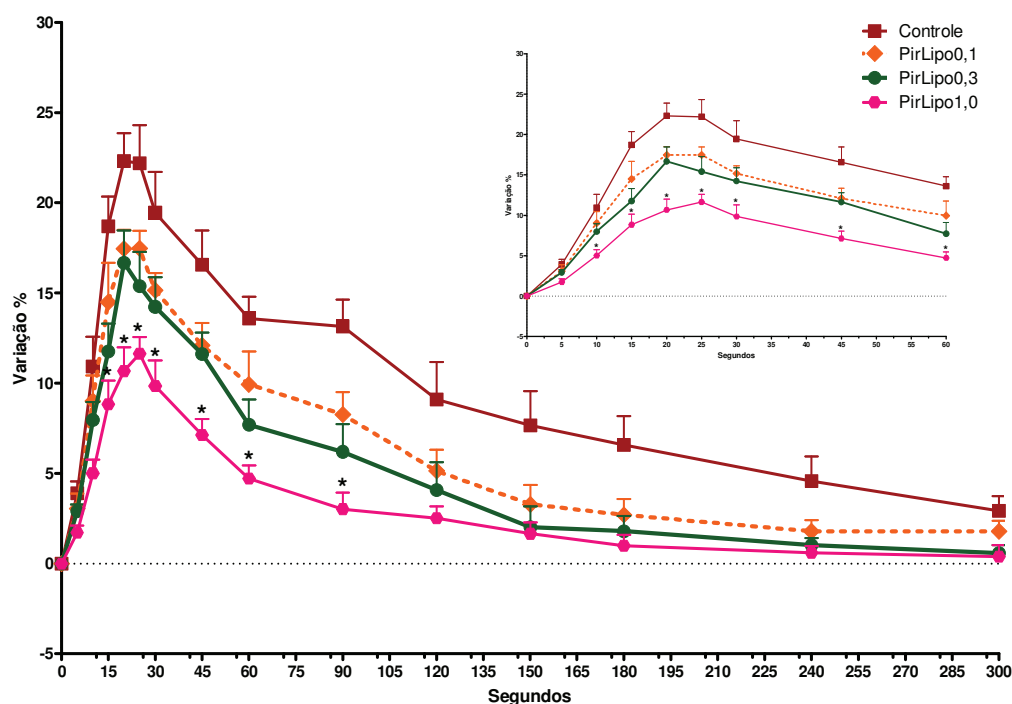


Figura 21: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

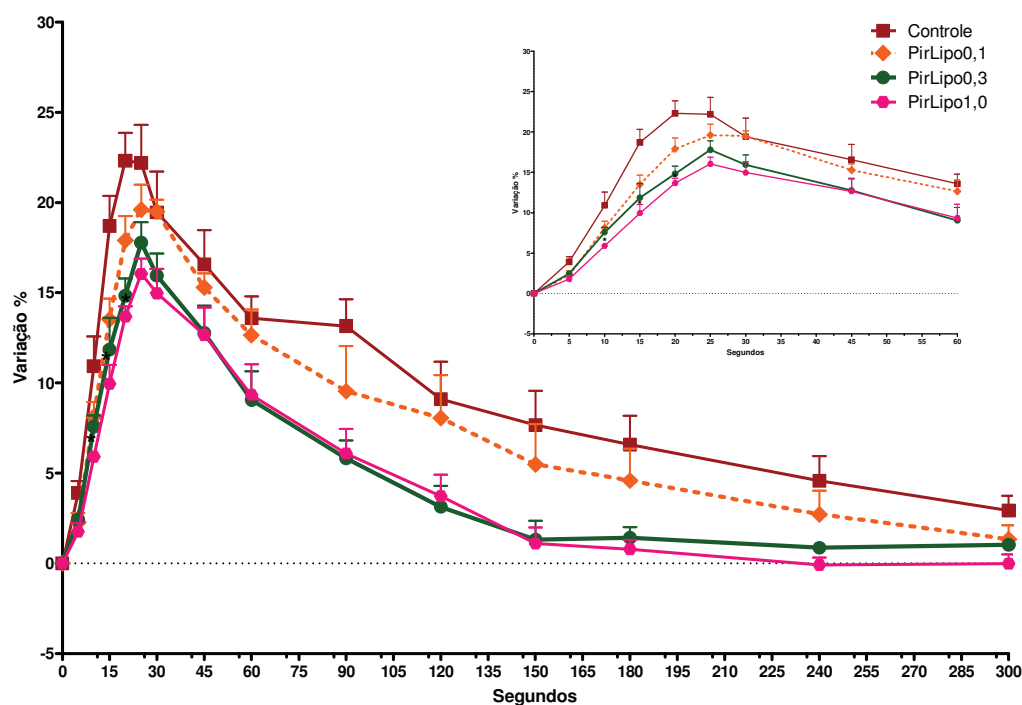


Figura 22: Variação percentual do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração IV de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

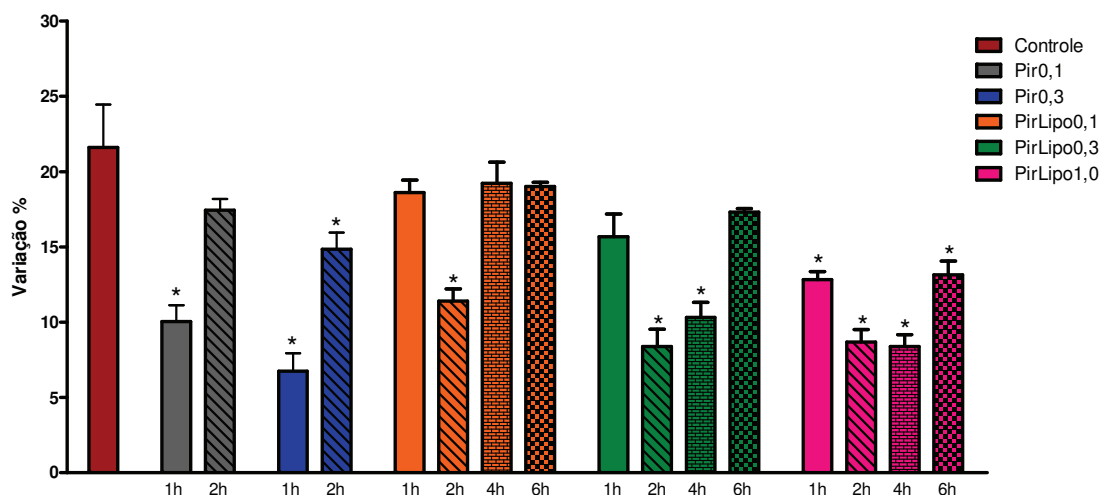


Figura 23: Variação percentual máxima do intervalo QT do ECG após administração IV de 1 µg de NA, nos diferentes tempos experimentais, após administração IV de Piridostigmina em diferentes doses. * P < 0,05 – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

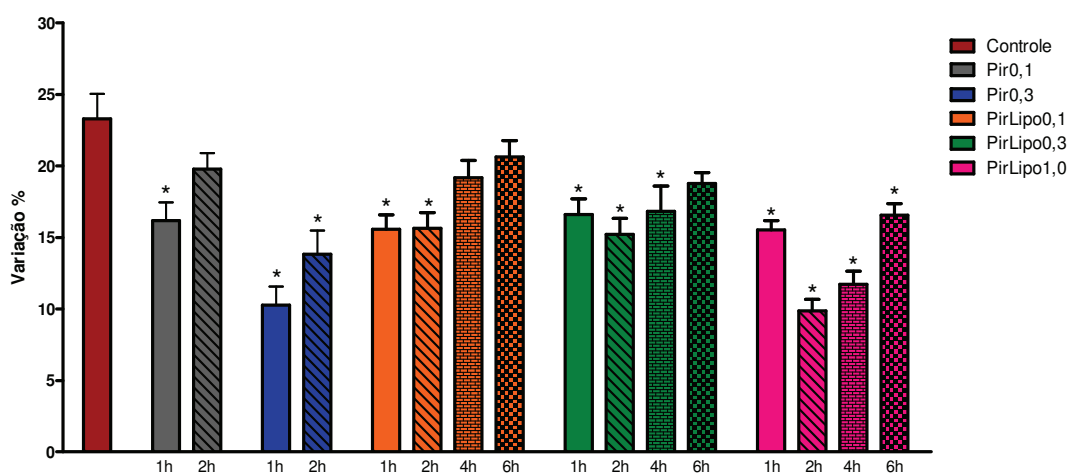


Figura 24: Variação percentual máxima do intervalo QT do ECG após administração IV de 3 µg de NA, nos diferentes tempos experimentais, após administração IV de Piridostigmina em diferentes doses. * P < 0,05 – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

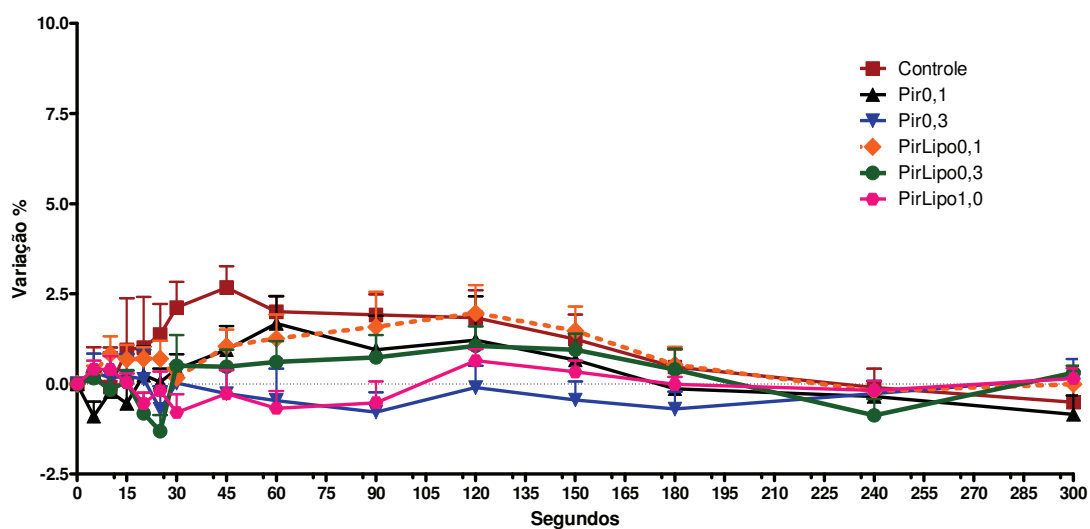


Figura 25: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

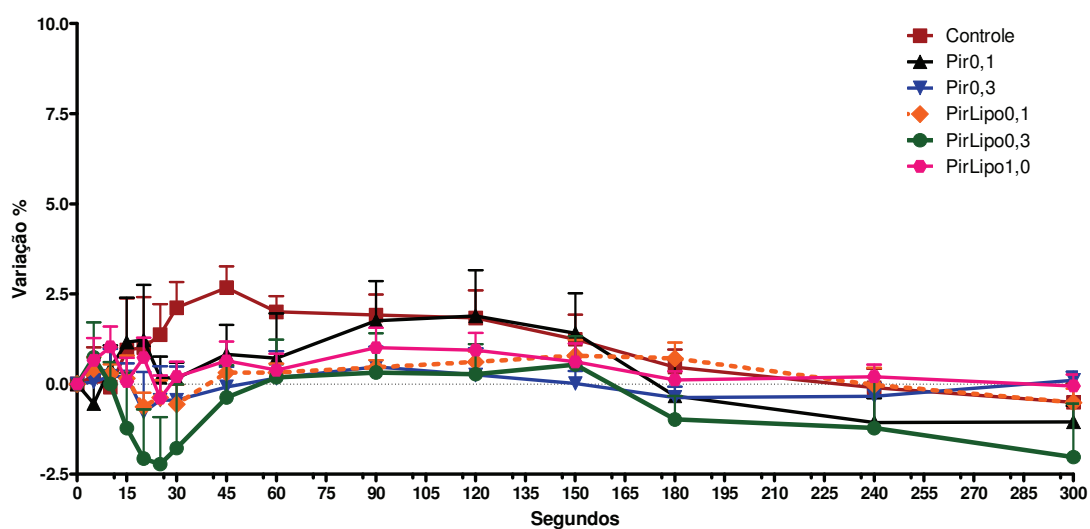


Figura 26: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

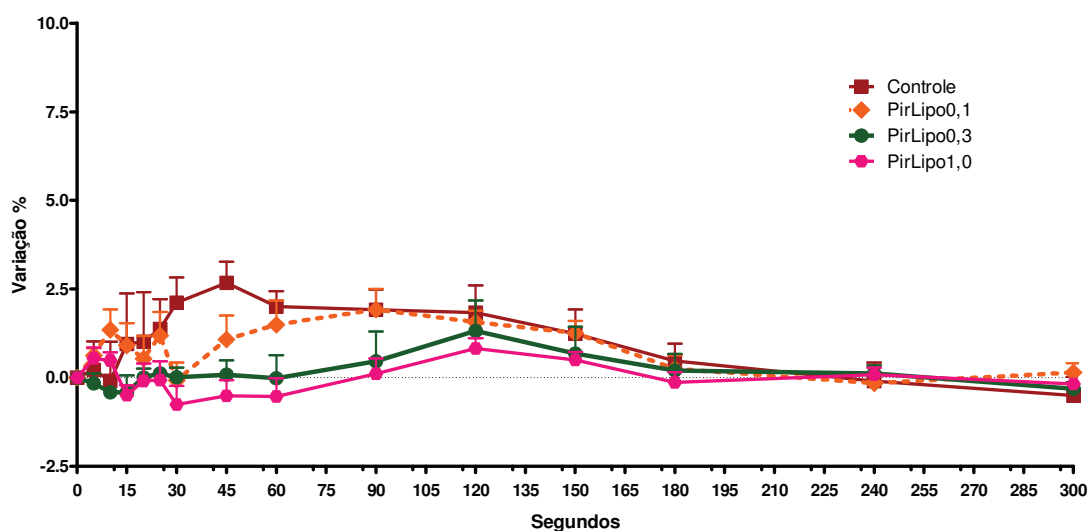


Figura 27: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

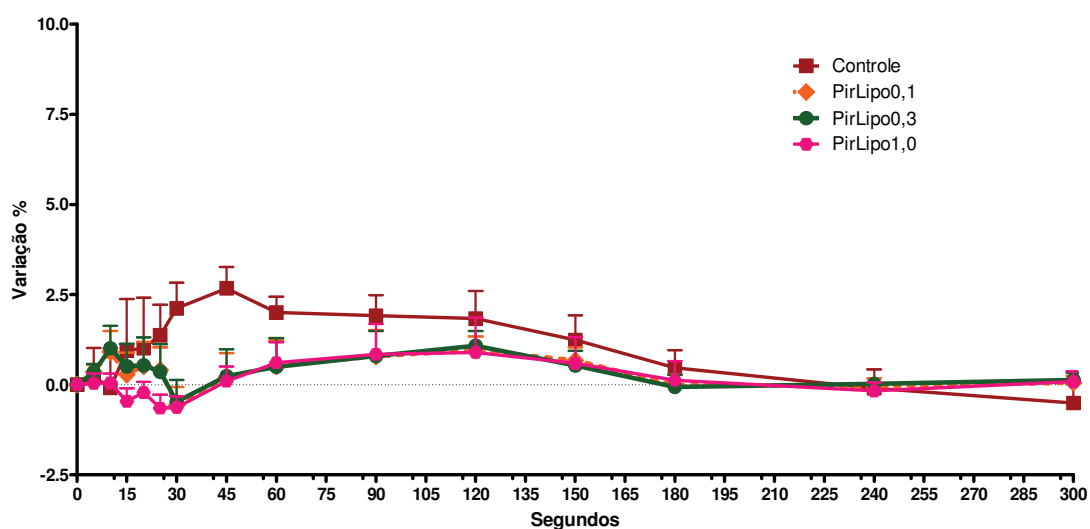


Figura 28: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

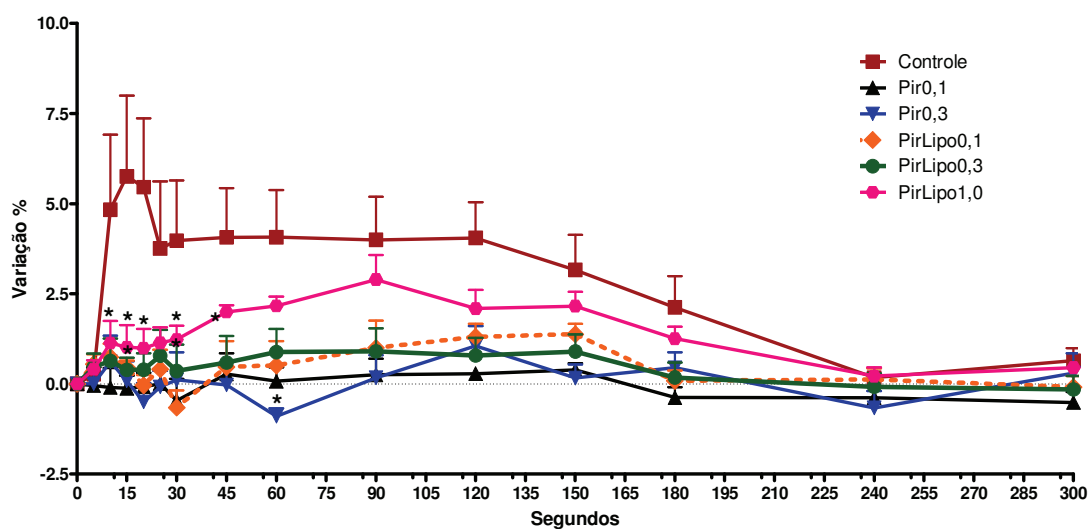


Figura 29: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3 μg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

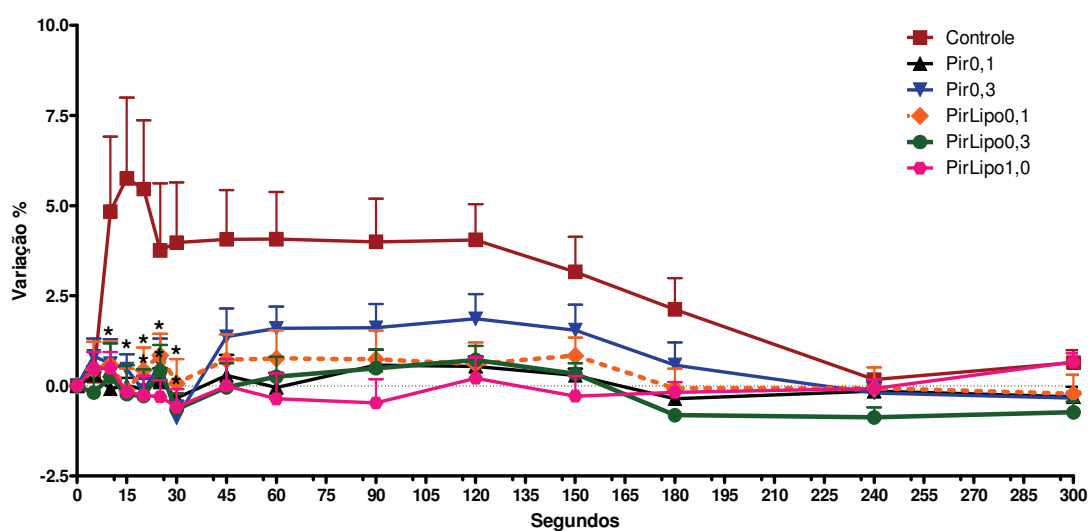


Figura 30: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3 μg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

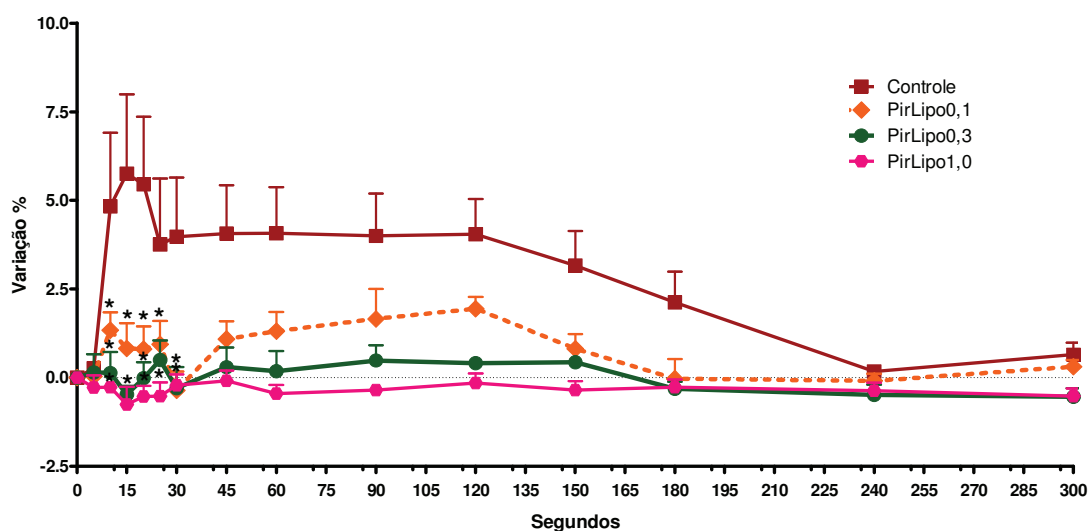


Figura 31: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

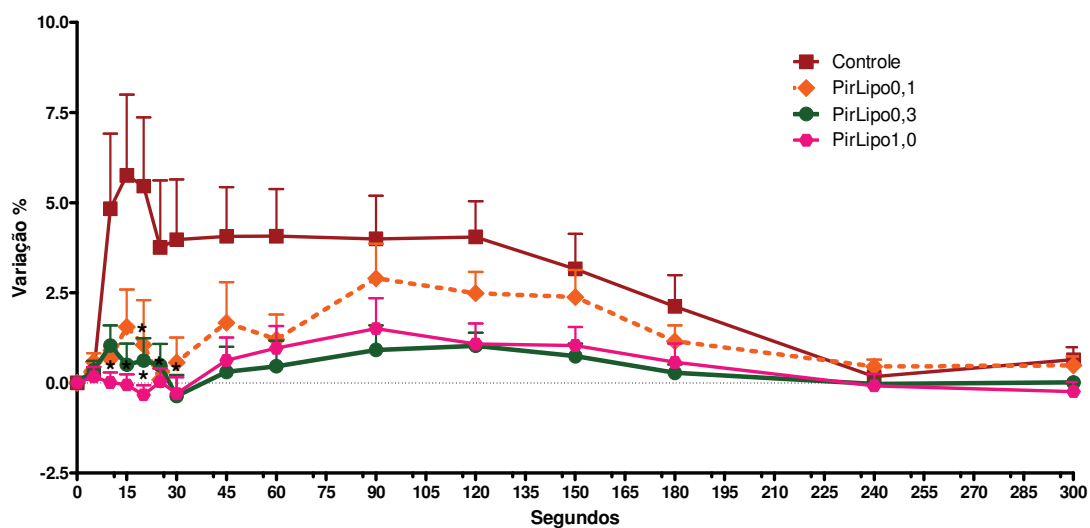


Figura 32: Variação percentual do intervalo PR do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

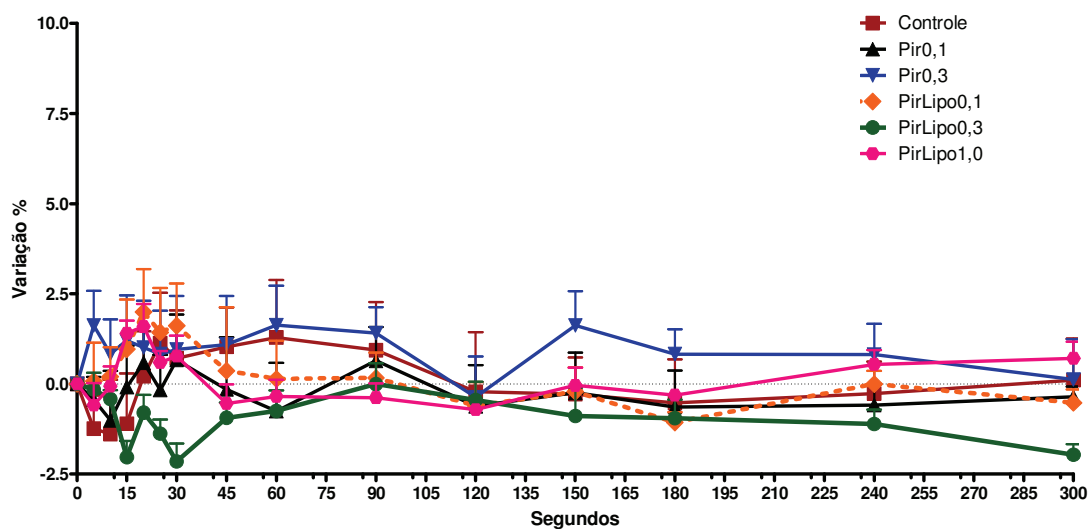


Figura 33: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

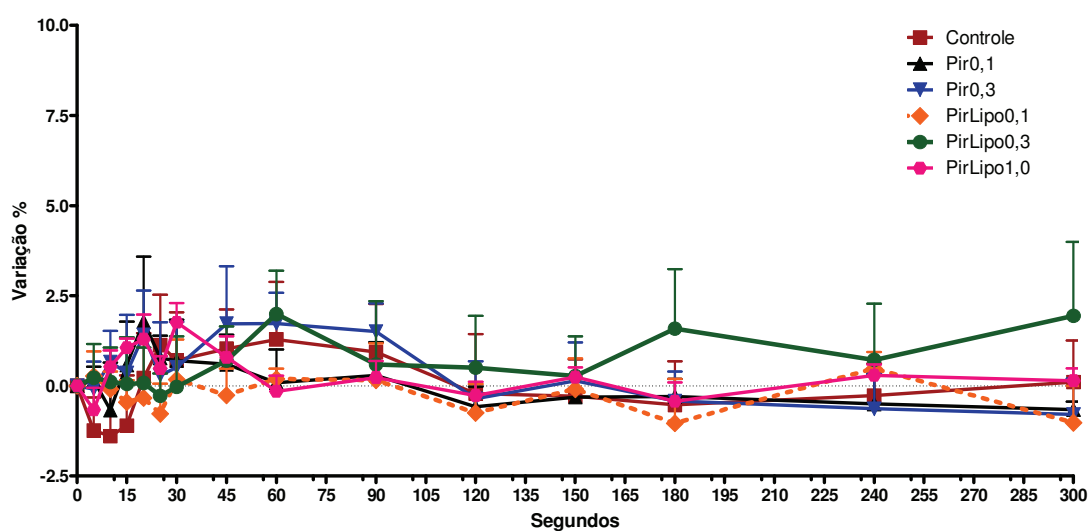


Figura 34: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

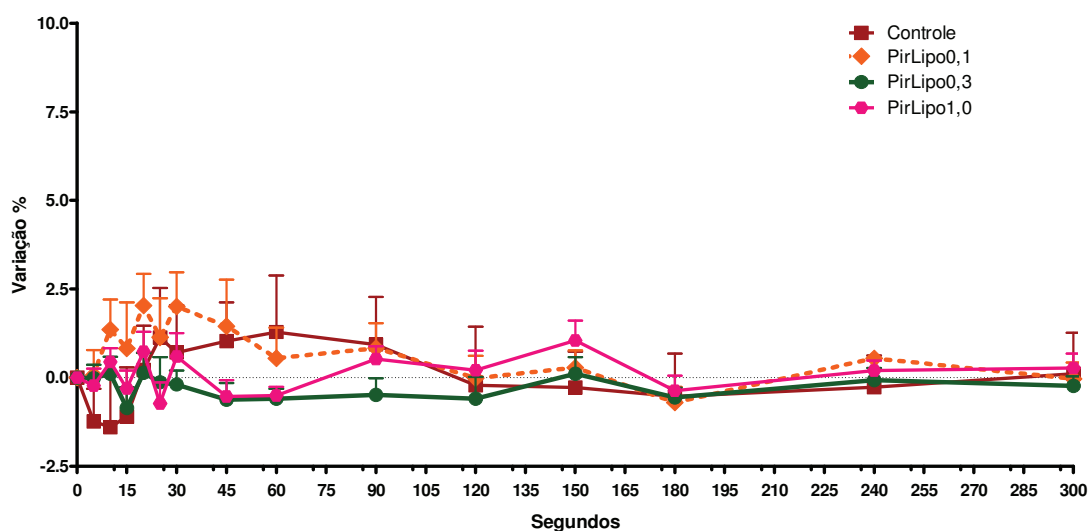


Figura 35: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

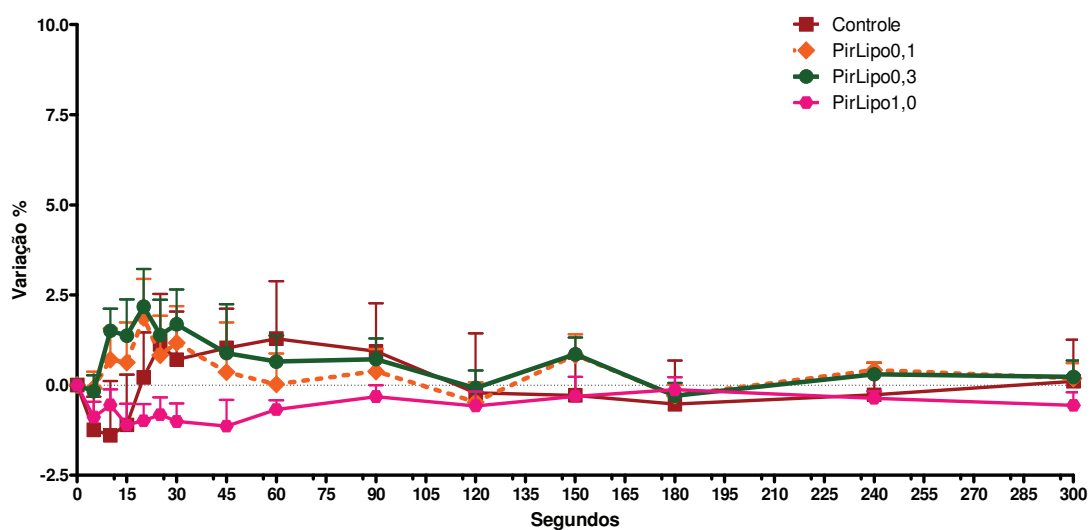


Figura 36: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

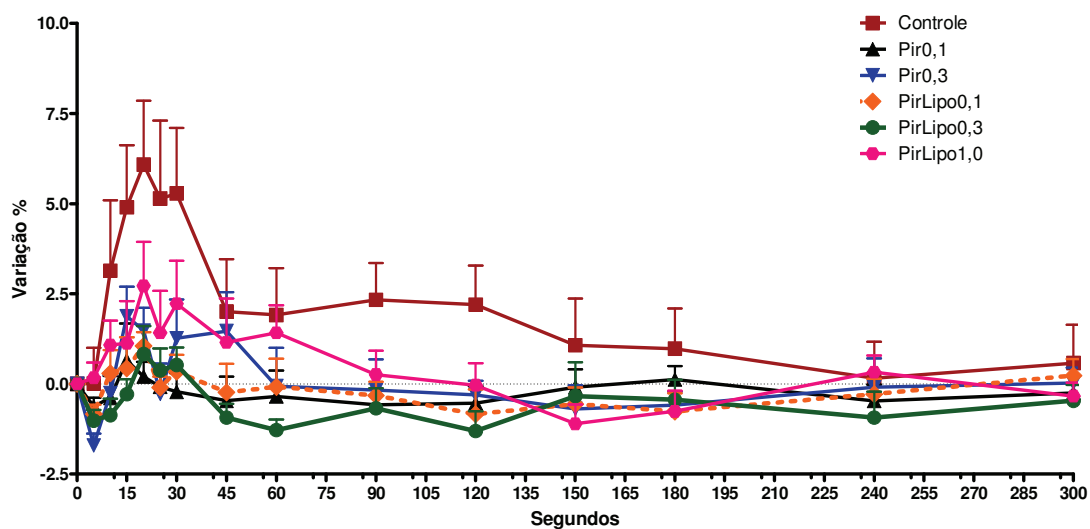


Figura 37: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

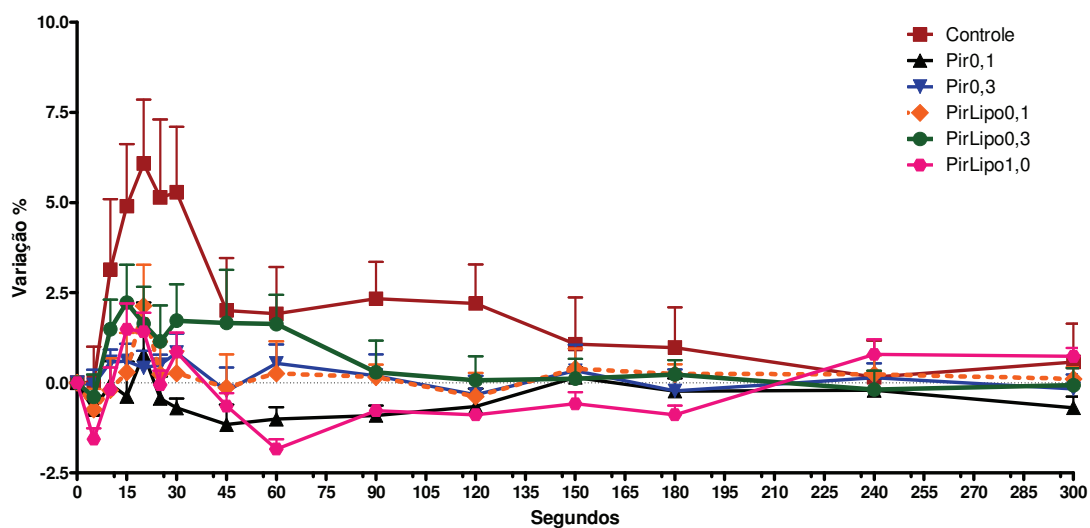


Figura 38: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

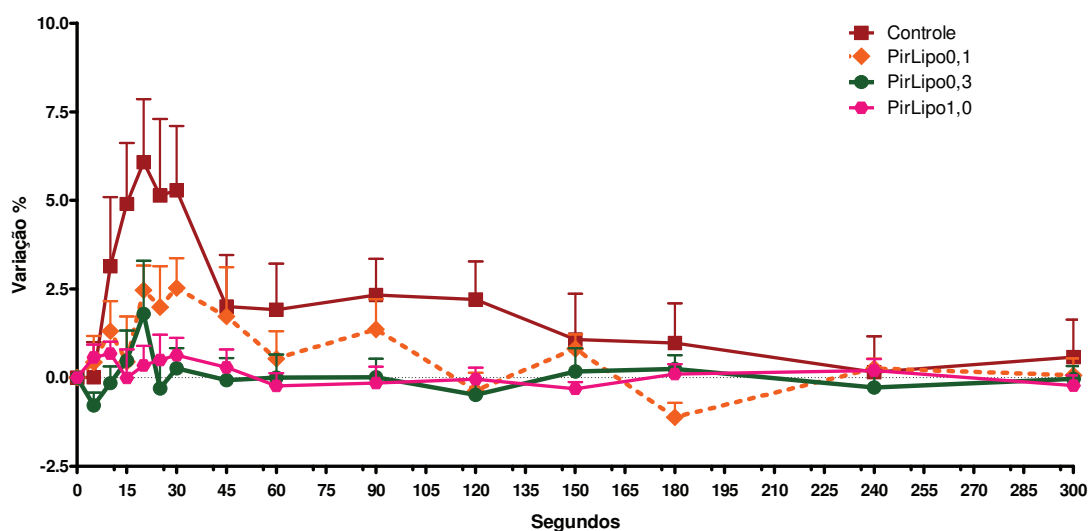


Figura 39: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

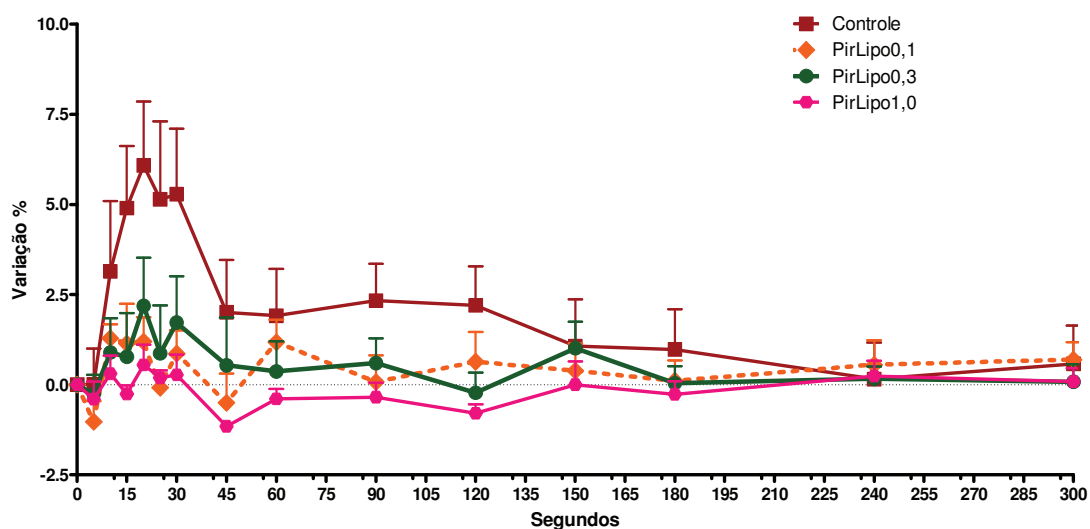


Figura 40: Variação percentual do complexo QRS do ECG após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

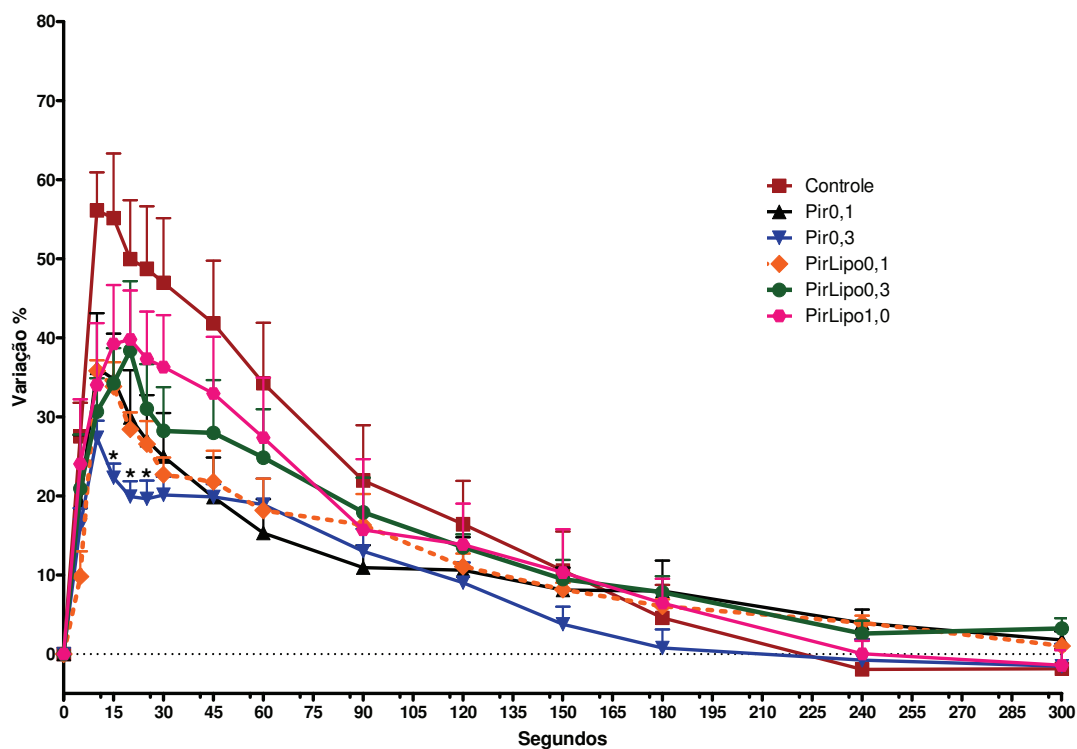


Figura 41: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 μ g de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

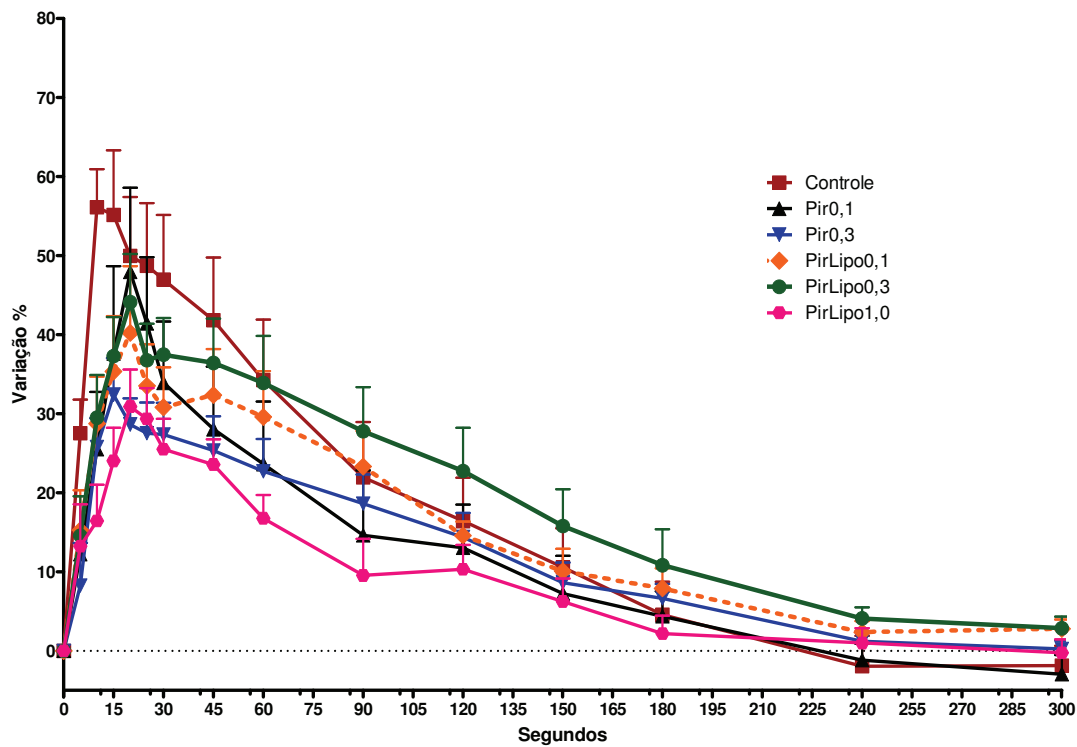


Figura 42: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 μ g de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

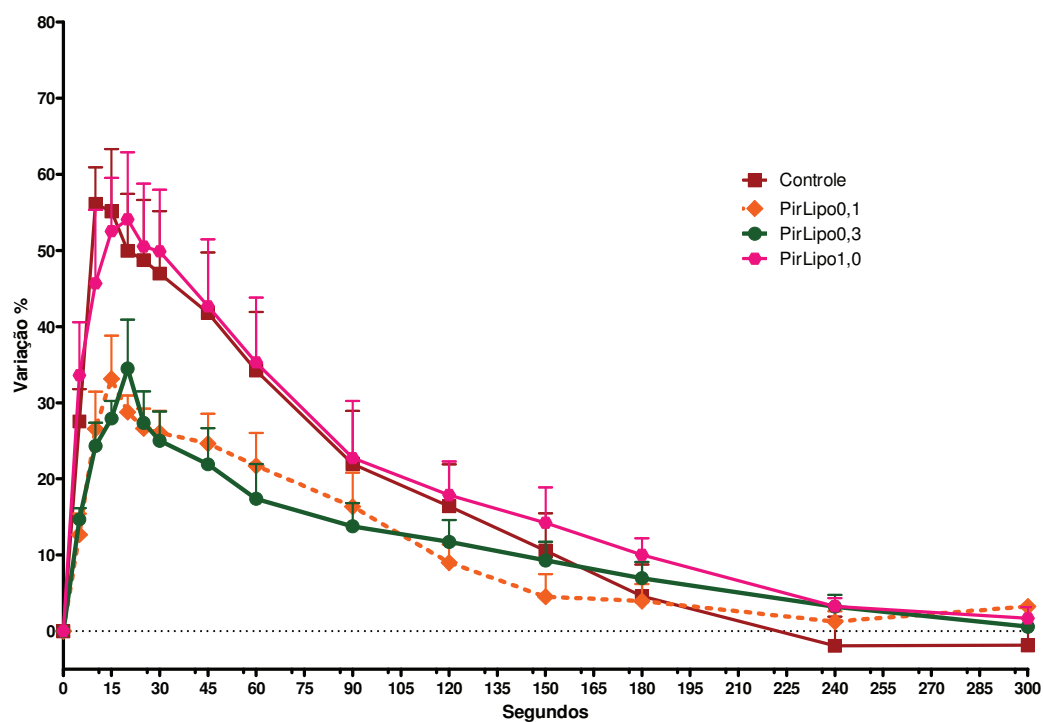


Figura 43: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

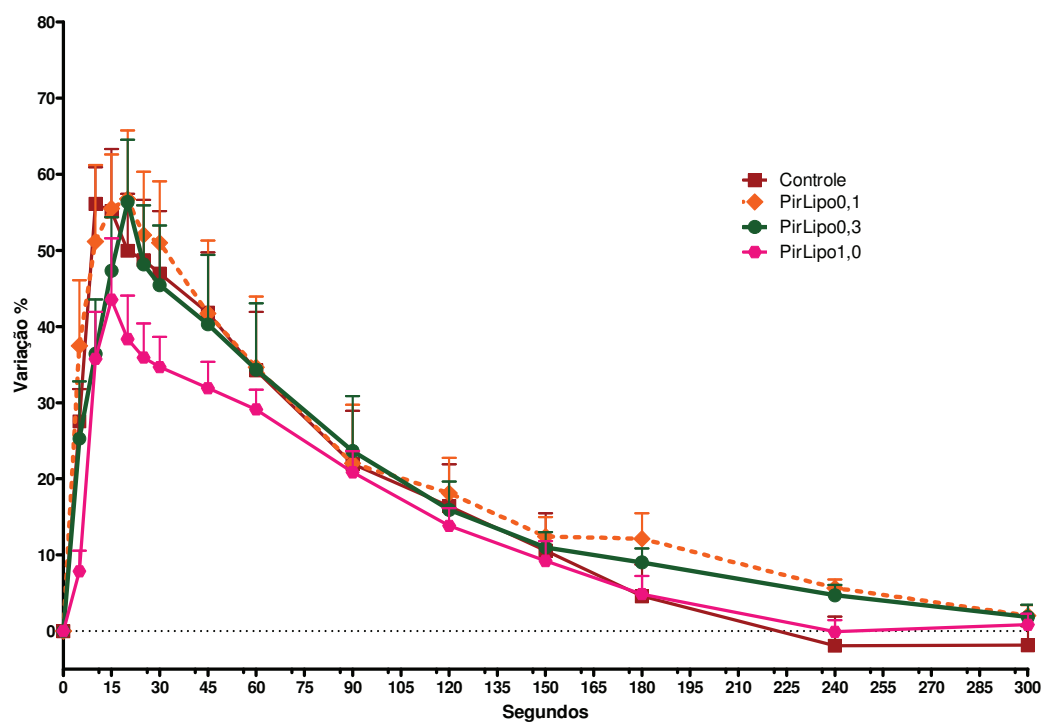


Figura 44: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

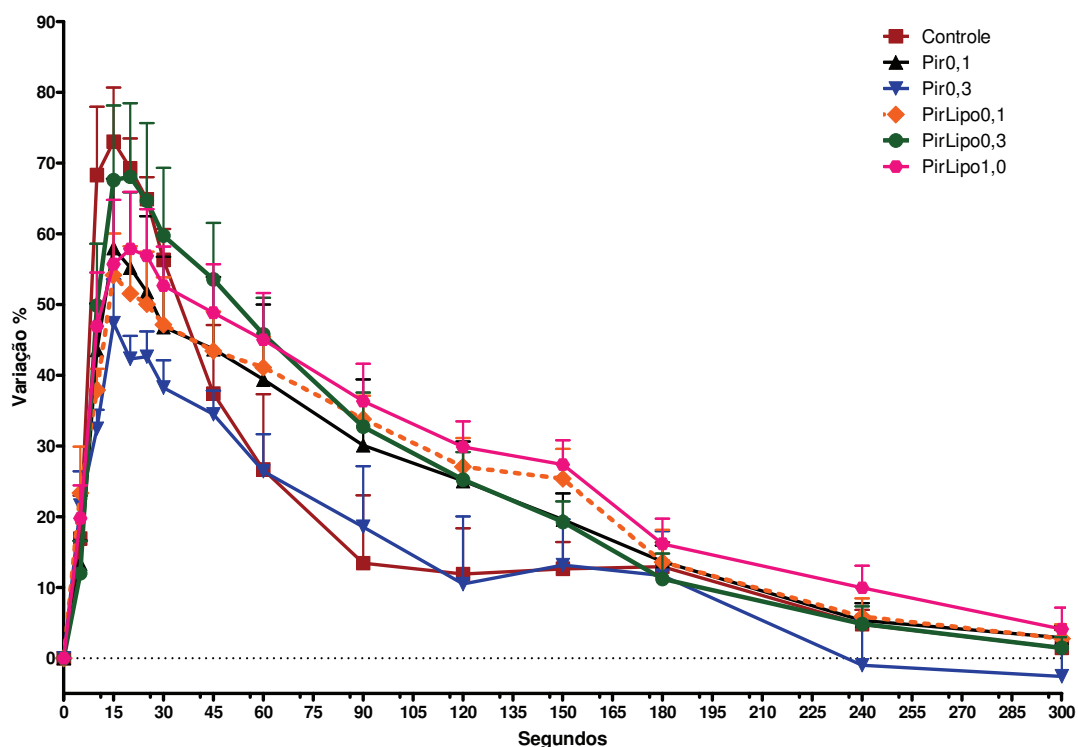


Figura 45: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. P > 0,05 – ANOVA.

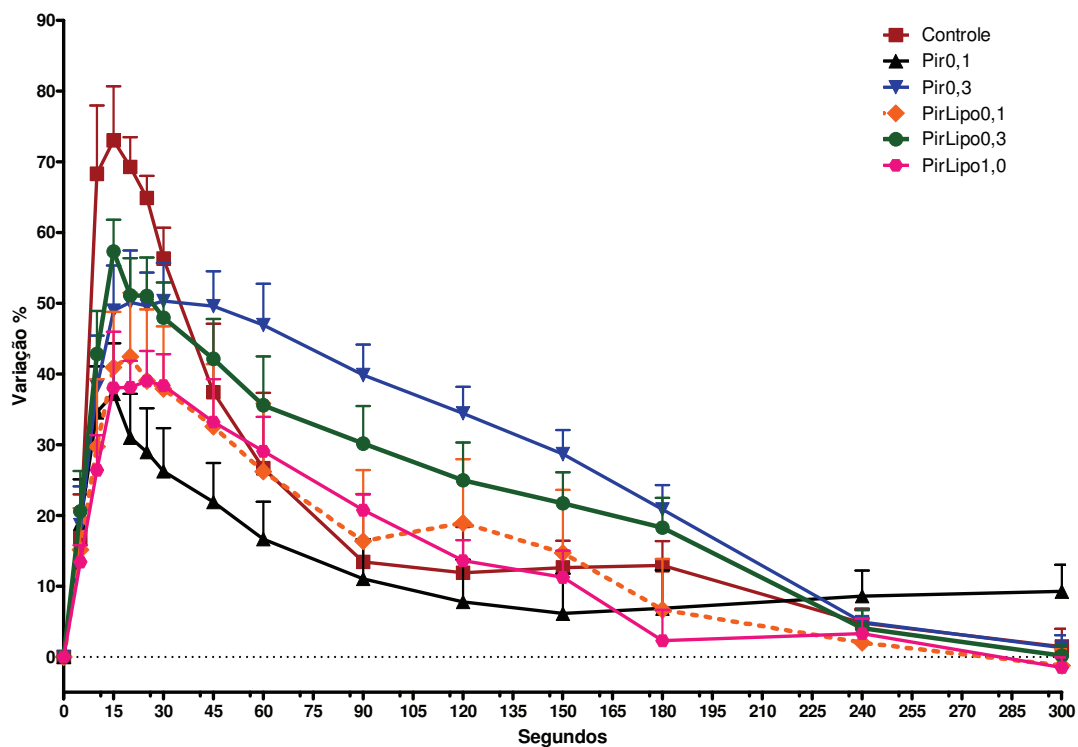


Figura 46: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. P > 0,05 – ANOVA.

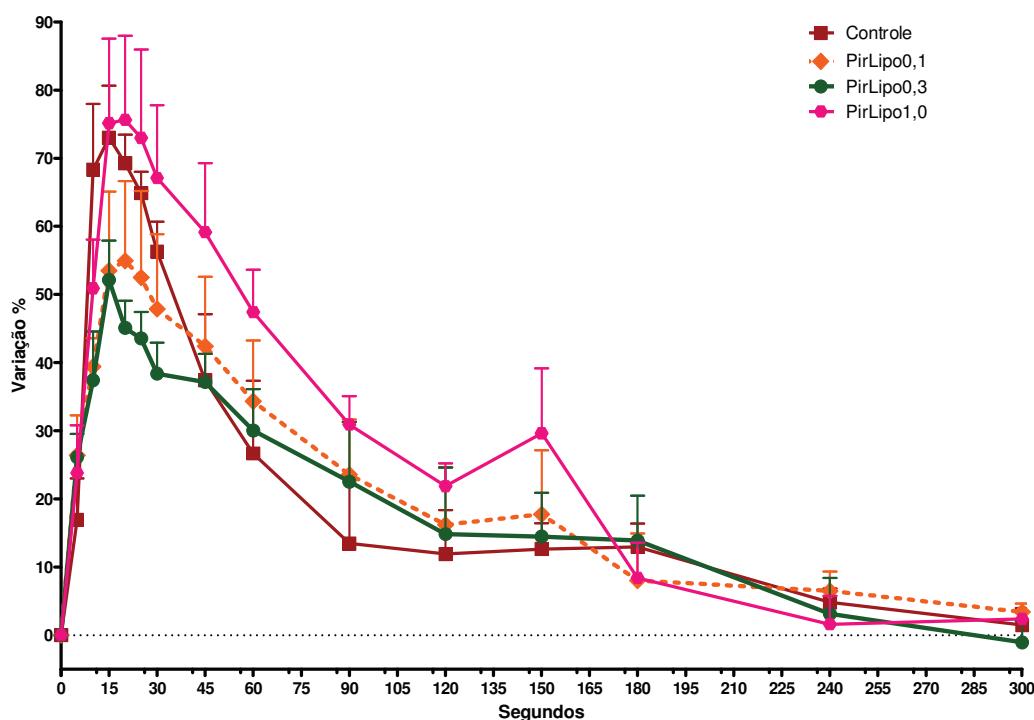


Figura 47: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. P > 0,05 – ANOVA.

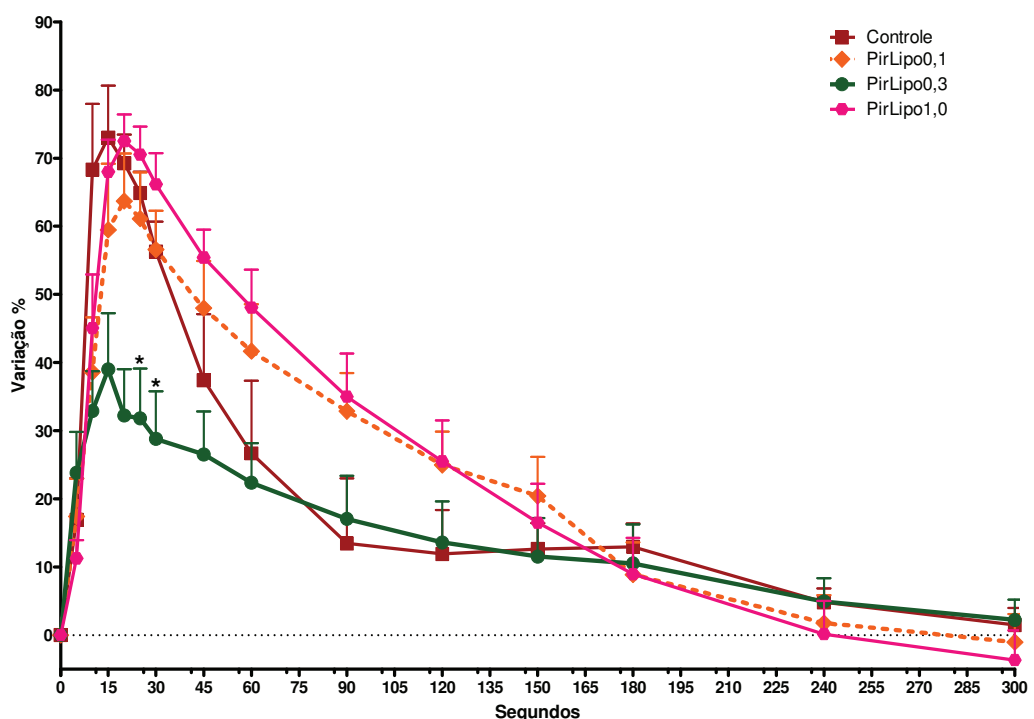


Figura 48: Variação percentual da Pressão Arterial Sistólica após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. * P < 0,05 – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

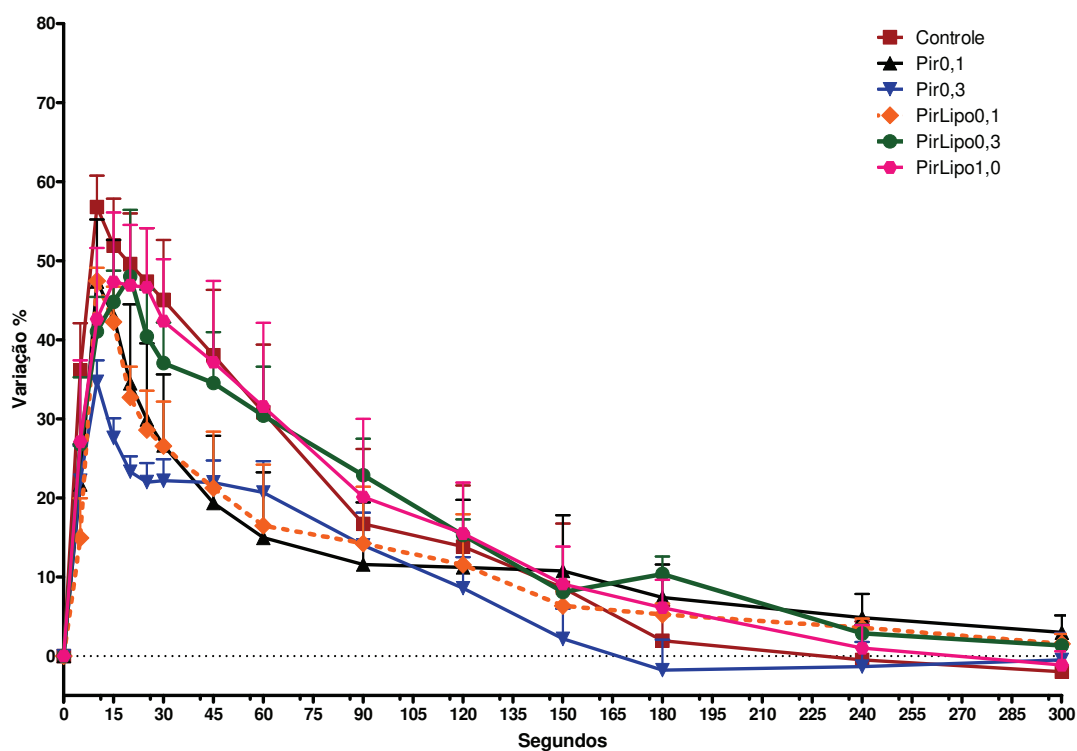


Figura 49: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

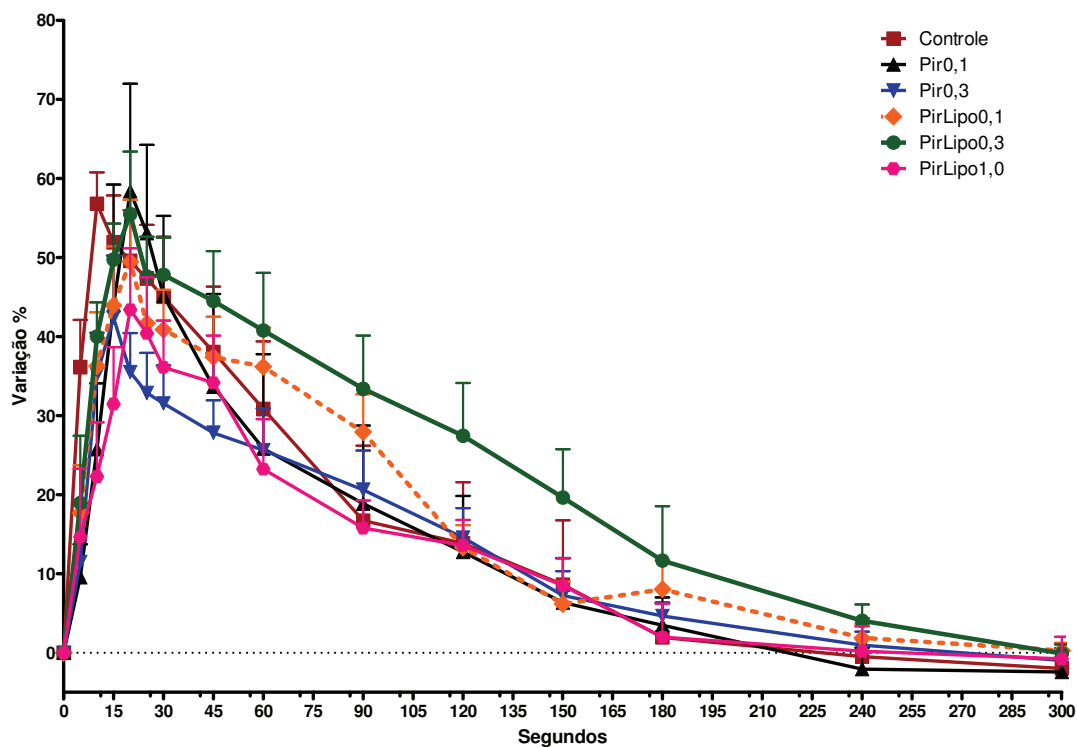


Figura 50: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

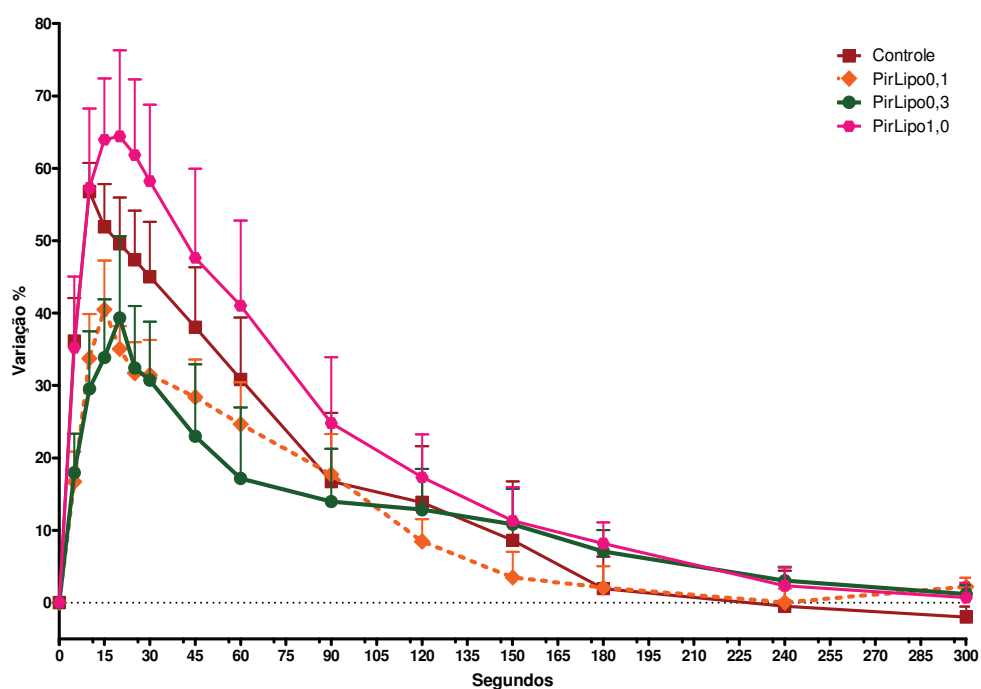


Figura 51: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

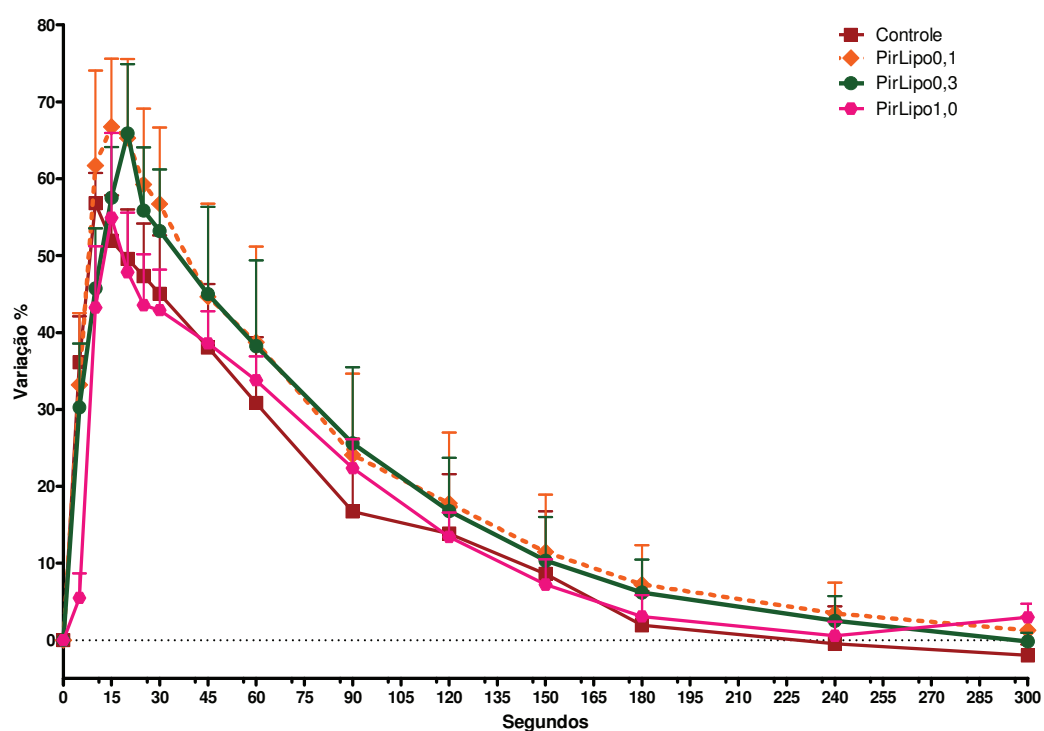


Figura 52: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

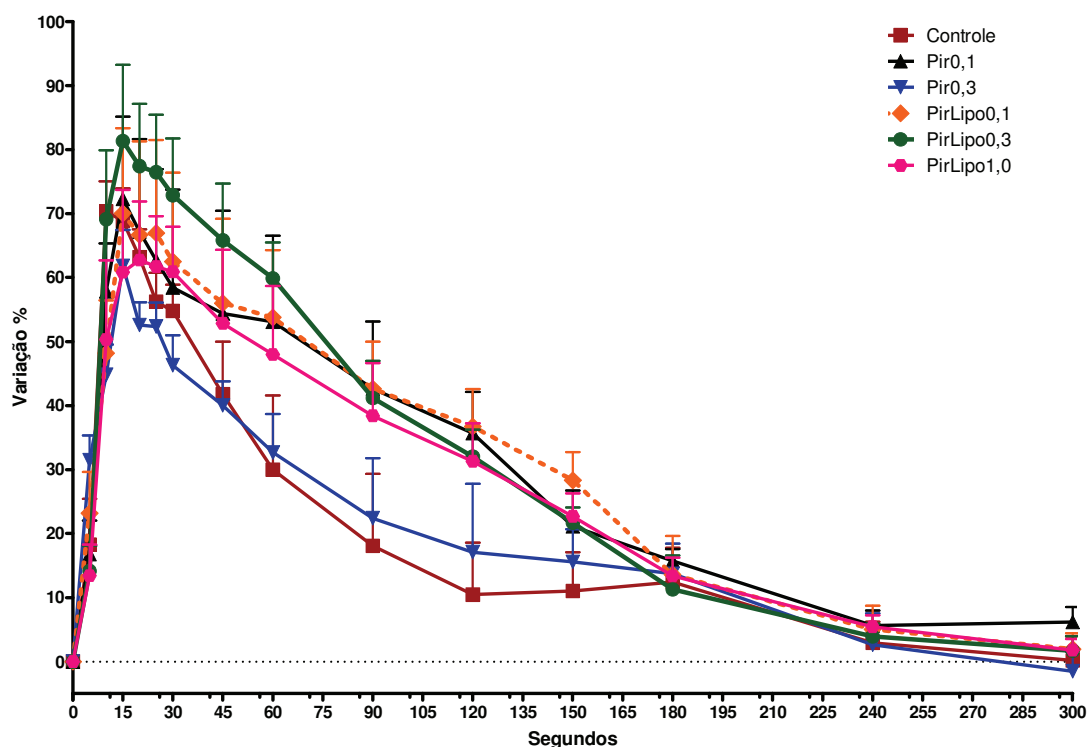


Figura 53: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

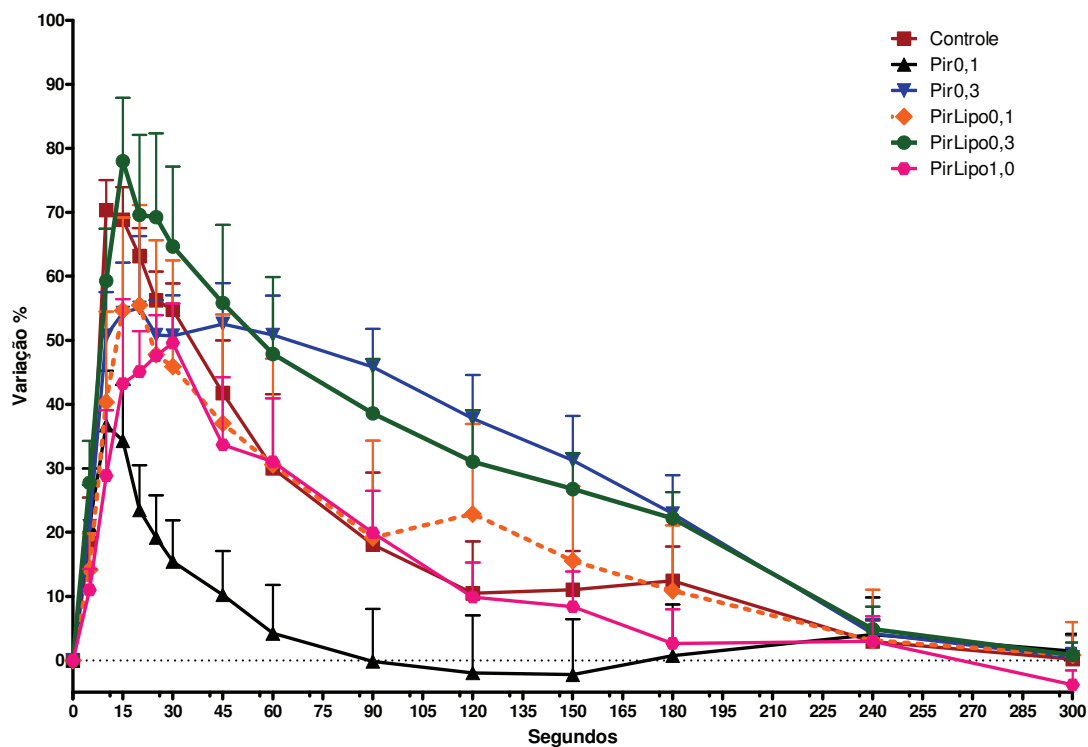


Figura 54: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

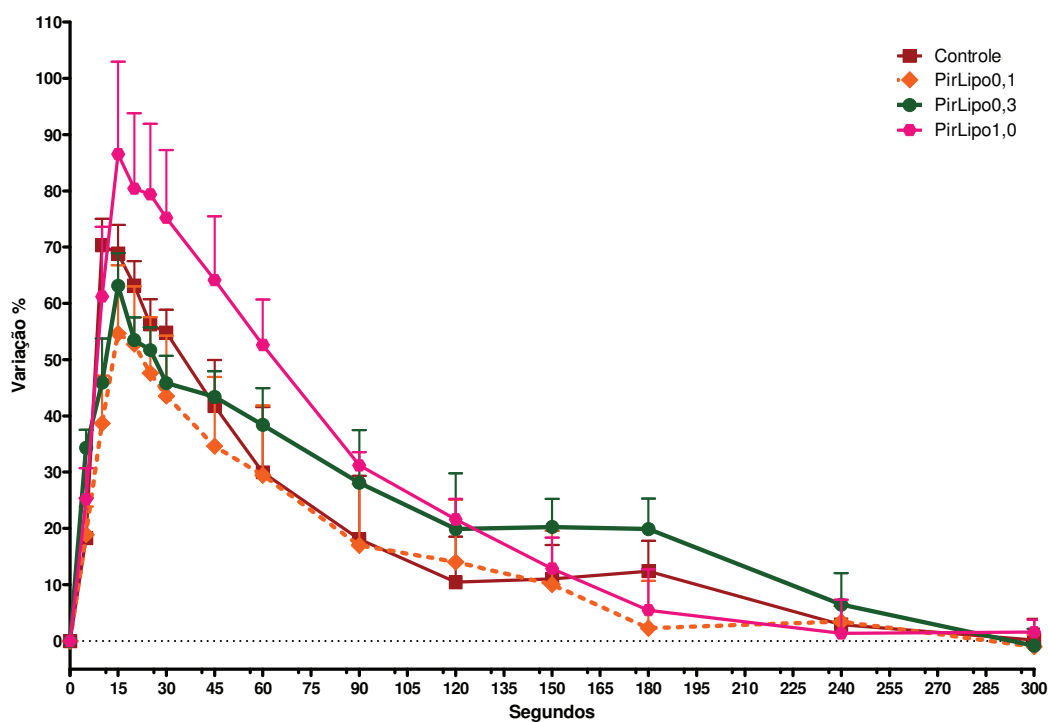


Figura 55: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

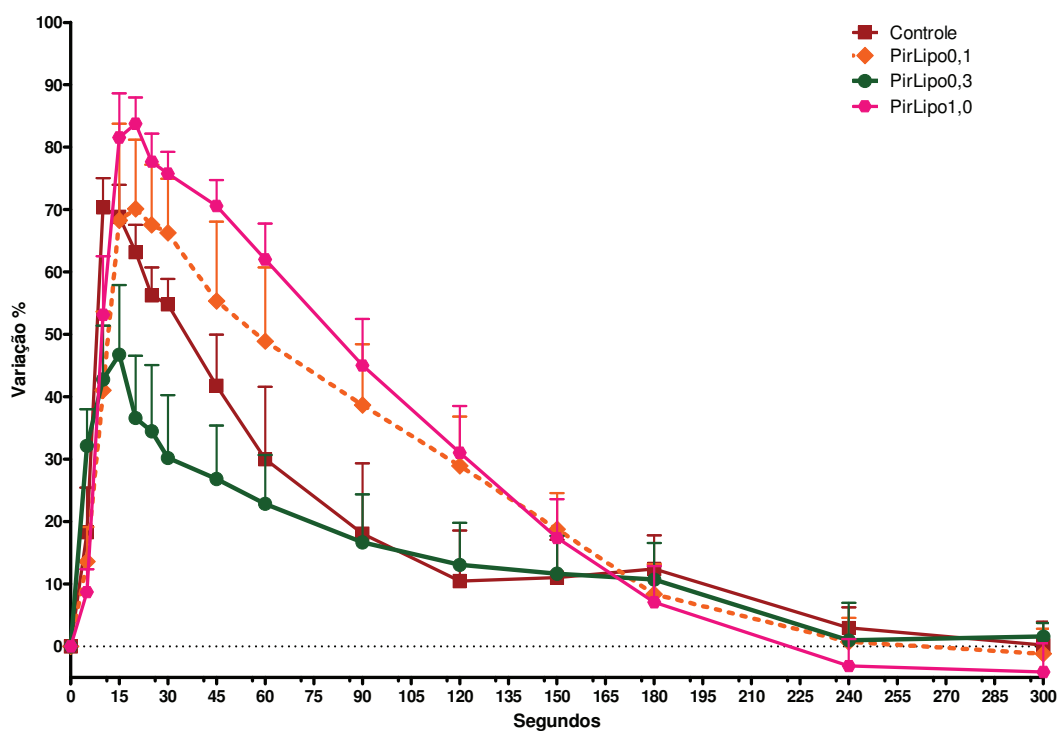


Figura 56: Variação percentual da Pressão Arterial Diastólica após administração IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

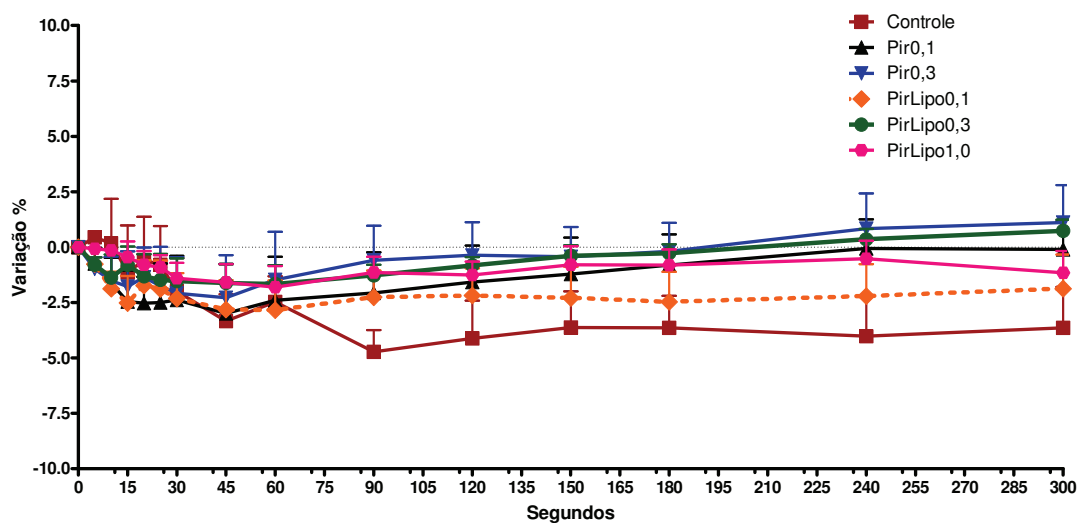


Figura 57: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 μ g de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

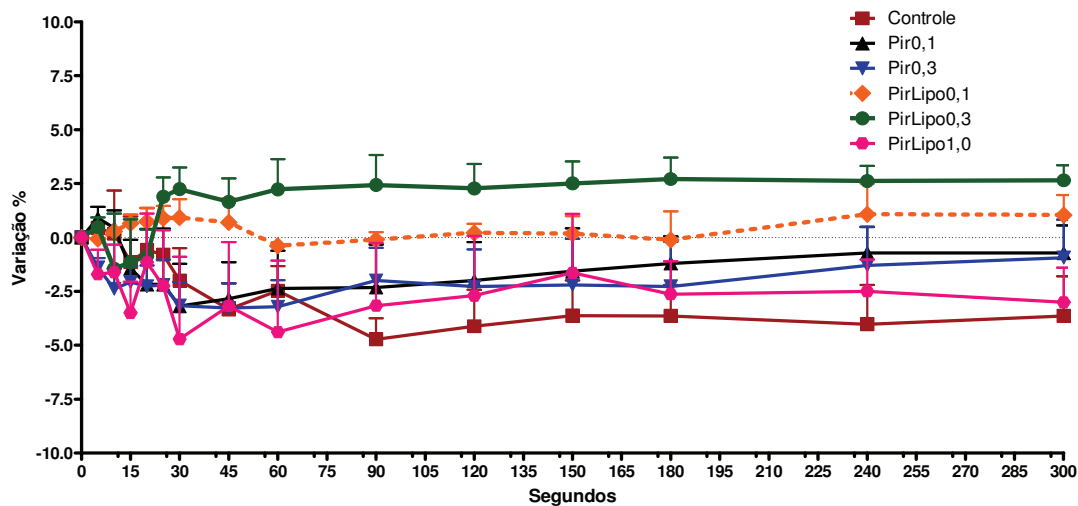


Figura 58: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 μ g de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

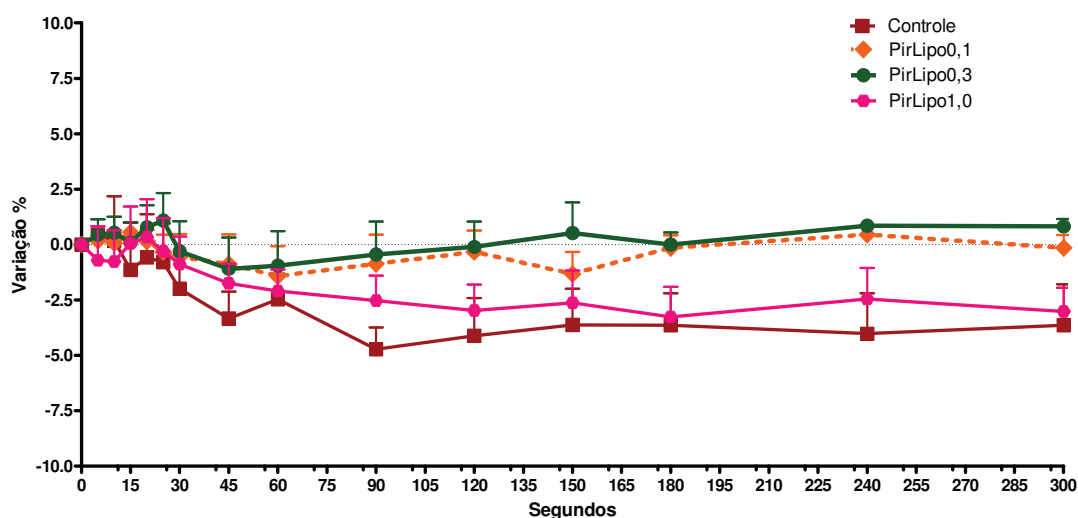


Figura 59: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 μ g de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

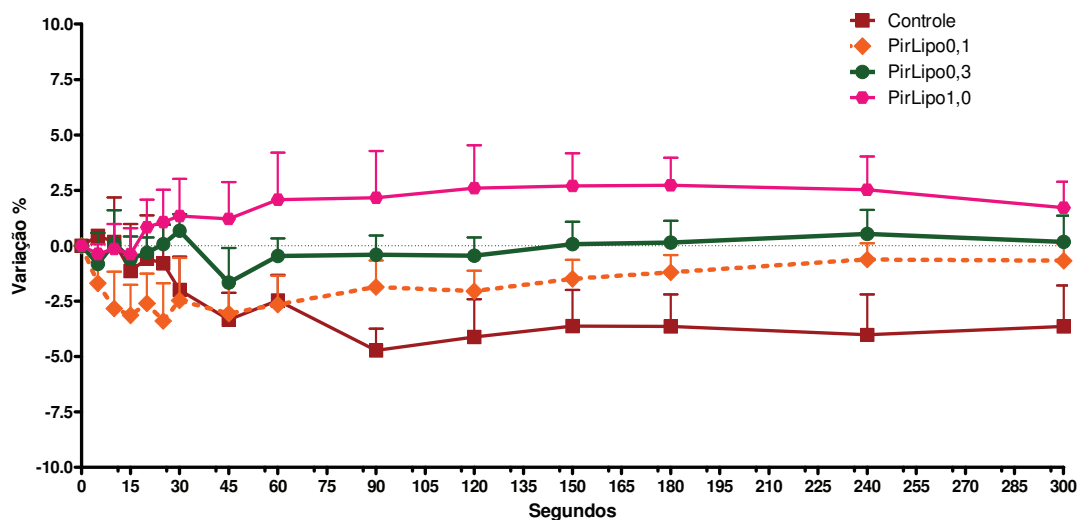


Figura 60: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 1 μ g de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

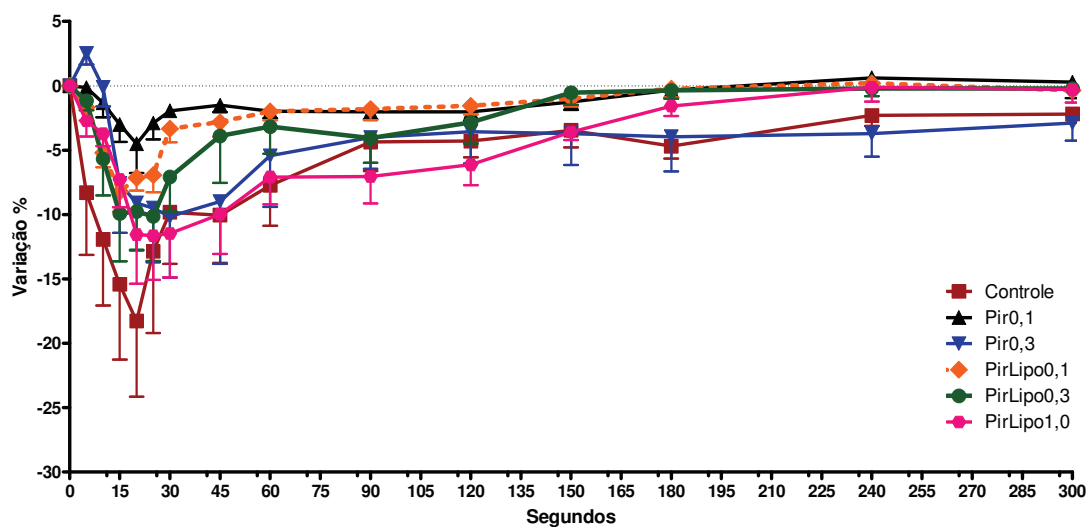


Figura 61: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

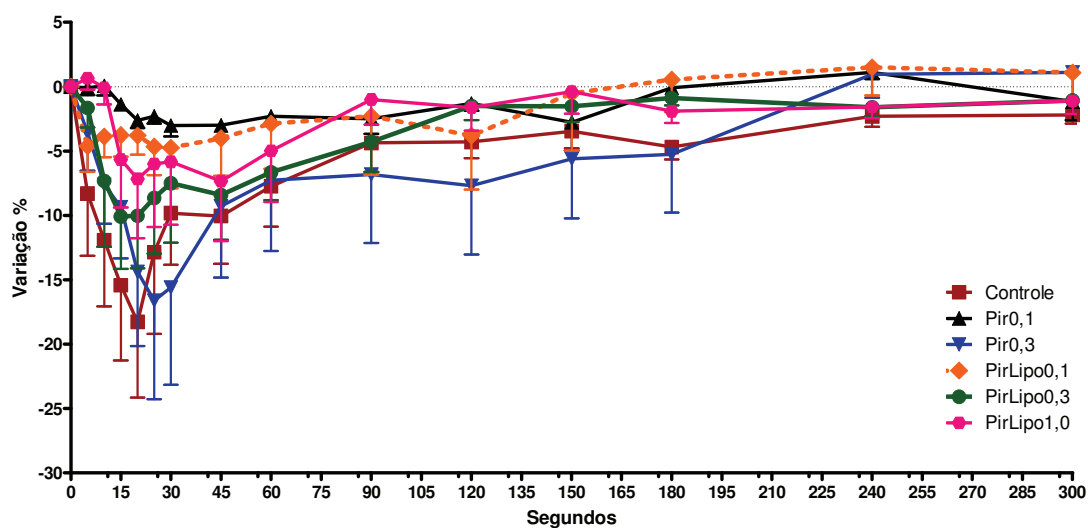


Figura 62: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

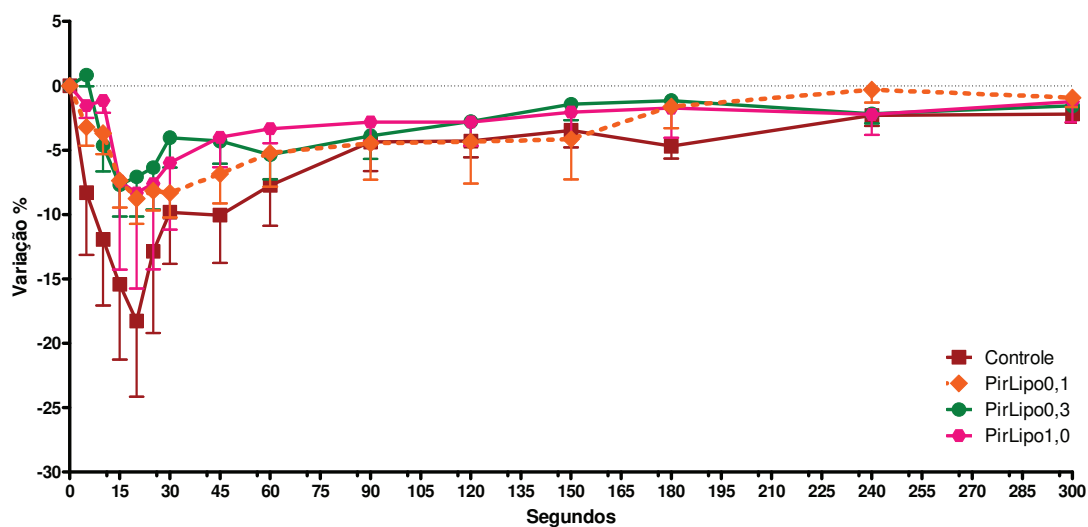


Figura 63: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 μ g de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

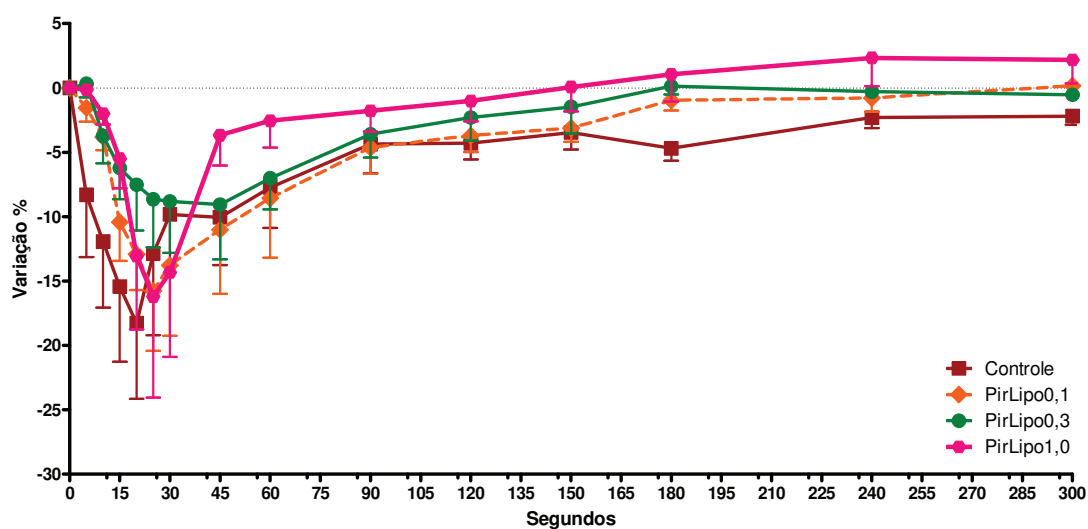


Figura 64: Variação percentual da Frequência Cardíaca após administração IV de 3 μ g de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. $P > 0,05$ – ANOVA.

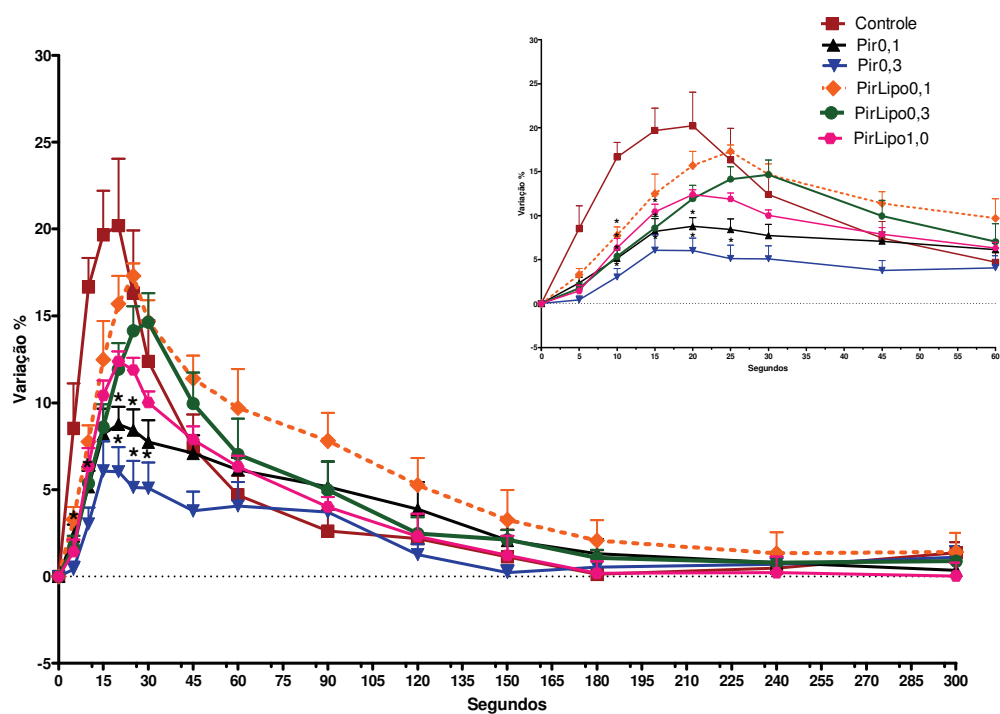


Figura 65: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 μ g de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

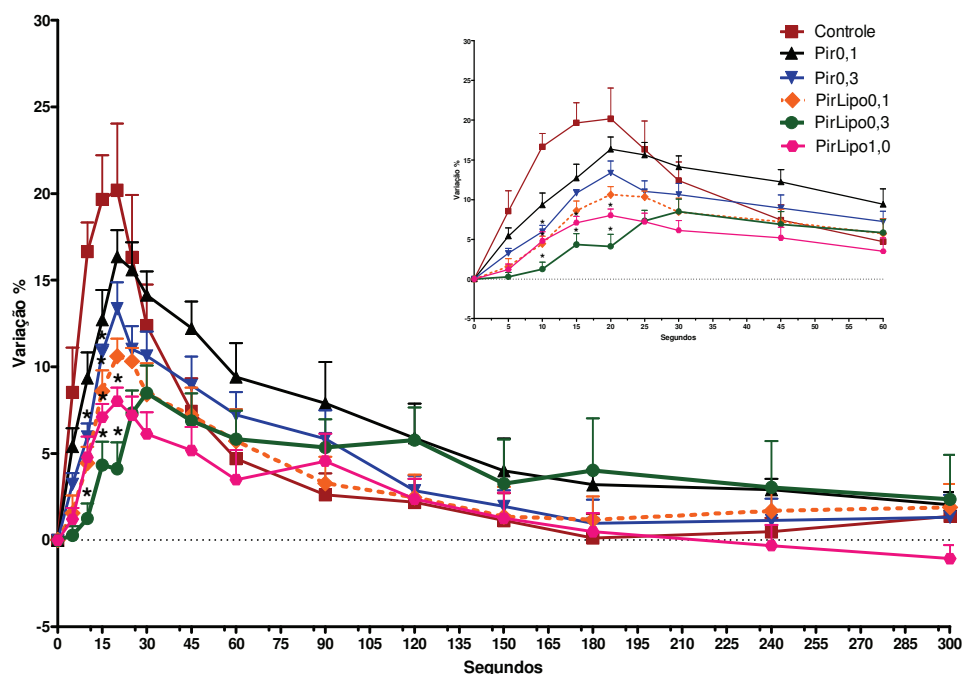


Figura 66: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 μ g de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

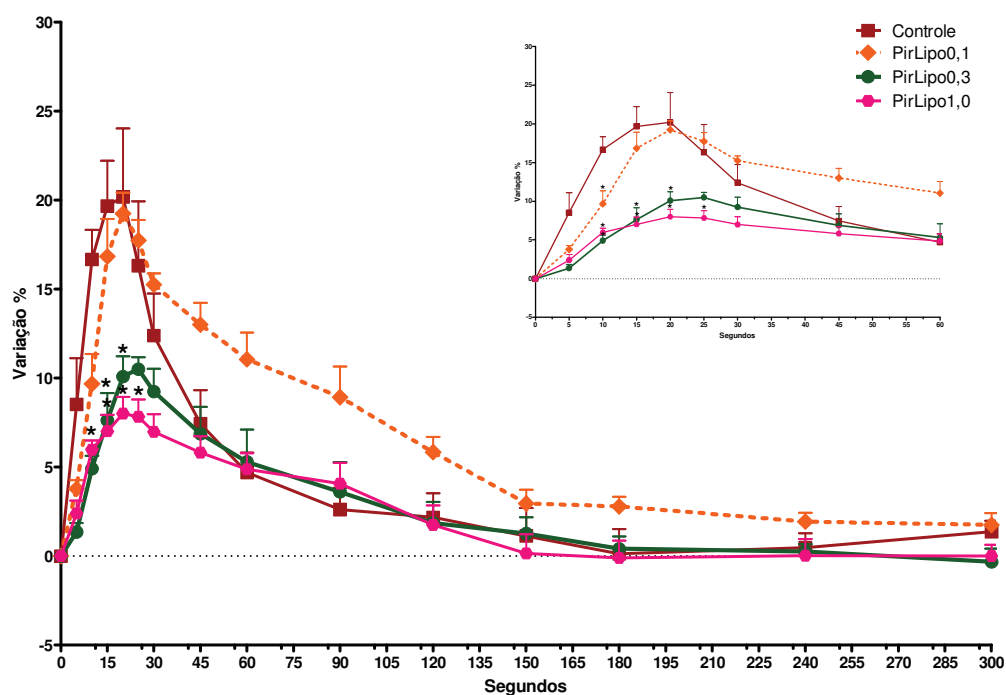


Figura 67: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 μ g de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

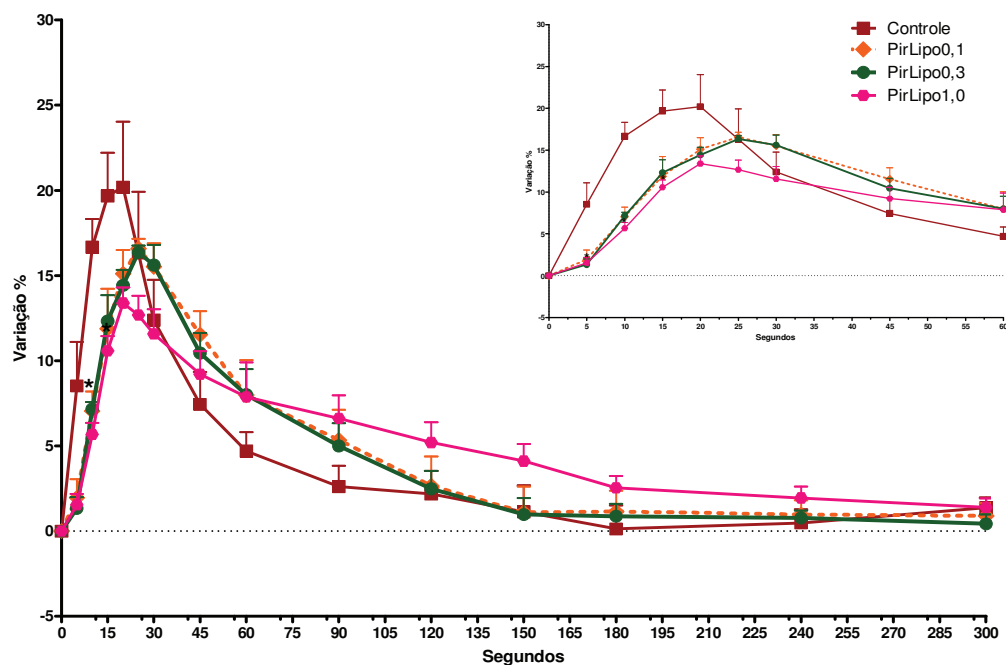


Figura 68: Variação percentual de QTc após administração IV de 1 μ g de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

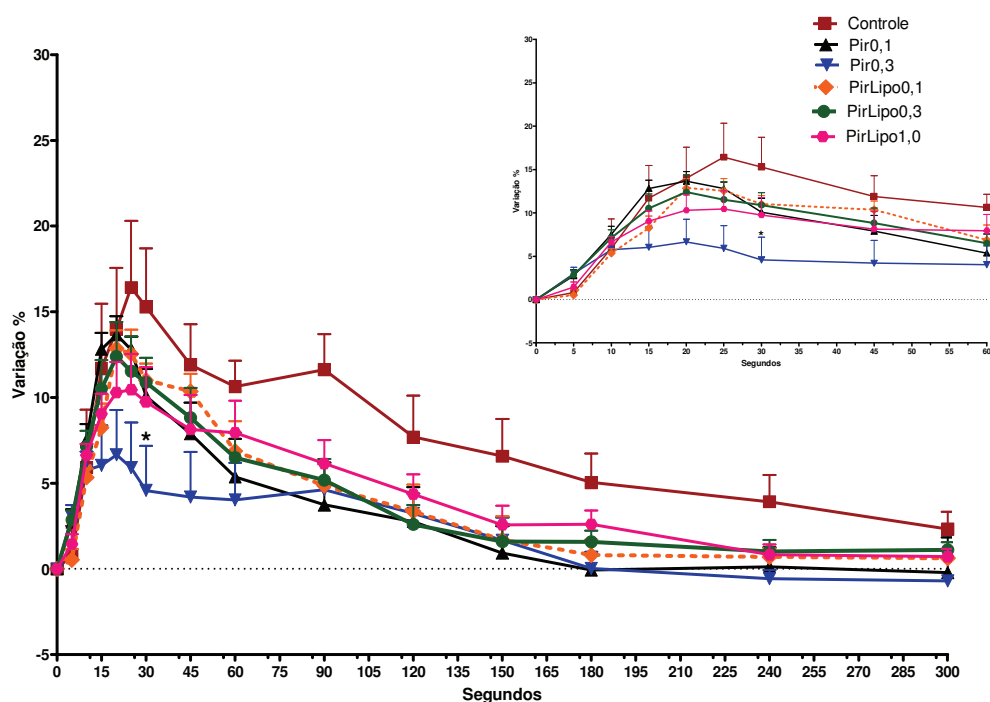


Figura 69: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 μ g de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. * $P < 0,05$ – ANOVA, seguido de teste de Tukey.

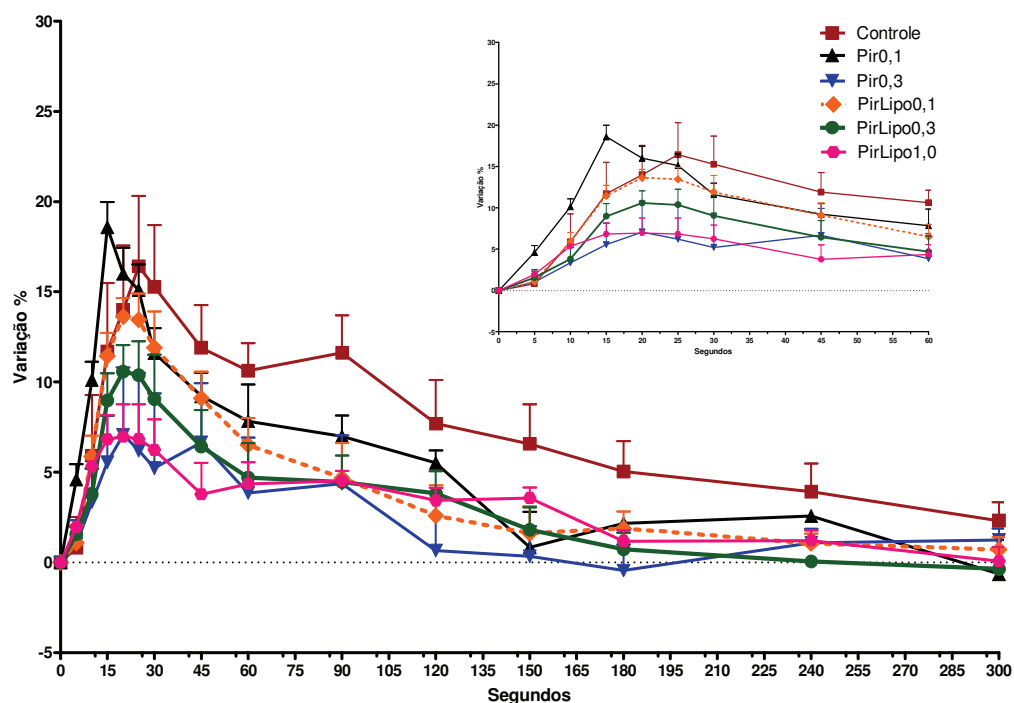


Figura 70: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 μ g de NA, 2 horas após a administração de Piridostigmina em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. $P > 0,05$ – ANOVA.

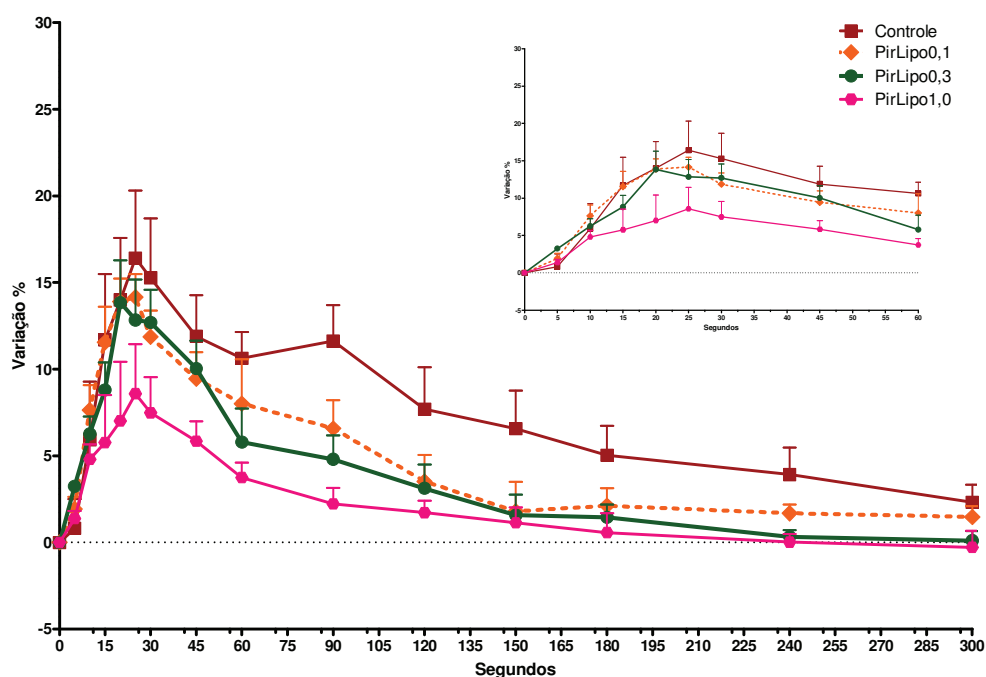


Figura 71: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 μ g de NA, 4 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. $P > 0,05$ – ANOVA.

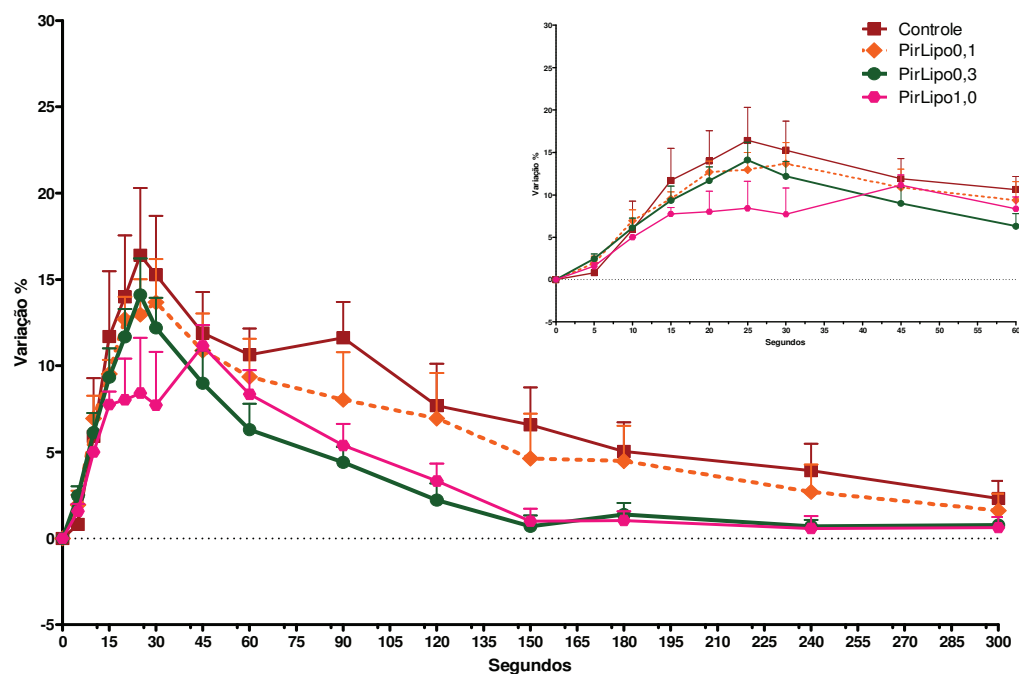


Figura 72: Variação percentual de QTc após administração IV de 3 μ g de NA, 6 horas após a administração de Piridostigmina lipossomal em diferentes doses. Em destaque, os 60 segundos iniciais após a estimulação simpática. $P > 0,05$ – ANOVA.

Tabela 7: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Controle		Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas
QT (ms)	0	63,4 ± 1,99	67,6 ± 1,31	65,1 ± 1,46	67,6 ± 1,31	71,7 ± 1,10	67,9 ± 1,02	66,2 ± 1,77	66,2 ± 1,77
	15	76,0 ± 2,87	76,8 ± 2,52	71,1 ± 2,07	76,8 ± 2,52	76,3 ± 1,18	74,1 ± 1,80	73,3 ± 2,34	73,3 ± 2,34
	30	71,4 ± 1,69	78,0 ± 1,34	70,8 ± 2,03	78,0 ± 1,34	75,6 ± 1,02	78,4 ± 1,66	73,2 ± 2,06	73,2 ± 2,06
	90	65,8 ± 1,82	73,4 ± 1,96	69,0 ± 2,04	73,4 ± 1,96	74,3 ± 1,21	71,6 ± 1,45	69,2 ± 2,19	69,2 ± 2,19
	300	64,8 ± 2,17	69,0 ± 1,62	65,3 ± 1,54	69,0 ± 1,62	72,1 ± 1,24	68,4 ± 0,95	66,6 ± 2,00	66,6 ± 2,00
PR (ms)	0	49,4 ± 0,51	46,2 ± 1,33	47,1 ± 1,56	46,2 ± 1,33	44,9 ± 1,48	53,8 ± 0,96	46,8 ± 1,44	46,8 ± 1,44
	15	49,8 ± 0,34	46,5 ± 1,32	47,1 ± 1,49	46,5 ± 1,32	45,0 ± 1,42	53,9 ± 0,86	46,8 ± 1,36	46,8 ± 1,36
	30	50,4 ± 0,28	46,3 ± 1,28	46,9 ± 1,36	46,3 ± 1,28	44,9 ± 1,53	54,1 ± 0,70	46,4 ± 1,29	46,4 ± 1,29
	90	50,3 ± 0,32	46,9 ± 1,37	47,2 ± 1,44	46,9 ± 1,37	44,6 ± 1,62	54,2 ± 1,04	46,6 ± 1,26	46,6 ± 1,26
	300	49,1 ± 0,42	46,2 ± 1,35	46,9 ± 1,51	46,2 ± 1,35	45,0 ± 1,43	54,0 ± 1,03	46,9 ± 1,44	46,9 ± 1,44
QRS (ms)	0	24,1 ± 0,80	21,7 ± 0,45	22,0 ± 0,39	21,7 ± 0,45	23,1 ± 2,19	23,6 ± 0,18	21,4 ± 0,47	21,4 ± 0,47
	15	23,8 ± 0,74	21,9 ± 0,39	22,1 ± 0,48	21,9 ± 0,39	23,3 ± 2,22	23,1 ± 0,14	21,7 ± 0,46	21,7 ± 0,46
	30	24,2 ± 0,60	22,0 ± 0,46	22,0 ± 0,43	22,0 ± 0,46	23,2 ± 2,12	23,1 ± 0,13	21,6 ± 0,50	21,6 ± 0,50
	90	24,3 ± 0,64	21,7 ± 0,46	21,9 ± 0,37	21,7 ± 0,46	23,4 ± 2,15	23,6 ± 0,20	21,3 ± 0,53	21,3 ± 0,53
	300	24,0 ± 0,76	21,6 ± 0,41	21,9 ± 0,41	21,6 ± 0,41	23,1 ± 2,32	23,1 ± 0,18	21,5 ± 0,41	21,5 ± 0,41
PAS (mmHg)	0	123,5 ± 6,34	124,1 ± 1,71	124,1 ± 1,71	127,0 ± 0,99	128,9 ± 2,11	124,6 ± 2,56	127,6 ± 2,90	127,6 ± 2,90
	15	189,6 ± 7,47	166,8 ± 4,39	166,8 ± 4,39	170,0 ± 3,50	157,7 ± 3,32	166,7 ± 2,54	178,3 ± 10,46	178,3 ± 10,46
	30	179,9 ± 8,81	154,7 ± 4,04	154,7 ± 4,04	155,8 ± 2,54	154,8 ± 3,00	159,1 ± 3,44	174,3 ± 9,15	174,3 ± 9,15
	90	149,7 ± 9,22	137,4 ± 1,41	137,4 ± 1,41	147,8 ± 4,91	145,5 ± 3,13	146,4 ± 3,19	148,4 ± 11,56	148,4 ± 11,56
	300	120,6 ± 4,74	126,3 ± 2,04	126,3 ± 2,04	128,3 ± 1,42	126,7 ± 2,52	128,4 ± 1,63	125,9 ± 4,09	125,9 ± 4,09
PAD (mmHg)	0	85,7 ± 3,60	83,4 ± 1,81	83,4 ± 1,81	86,9 ± 0,68	86,2 ± 3,15	86,0 ± 1,44	84,8 ± 3,88	84,8 ± 3,88
	15	129,3 ± 3,30	118,4 ± 5,09	118,4 ± 5,09	123,6 ± 3,25	109,7 ± 3,55	124,3 ± 2,57	125,7 ± 9,44	125,7 ± 9,44
	30	123,6 ± 6,15	104,8 ± 4,50	104,8 ± 4,50	110,0 ± 4,22	105,0 ± 3,18	117,7 ± 3,41	120,9 ± 8,16	120,9 ± 8,16
	90	99,6 ± 8,13	92,4 ± 4,02	92,4 ± 4,02	99,4 ± 5,63	97,9 ± 3,62	105,7 ± 3,75	102,1 ± 9,16	102,1 ± 9,16
	300	84,0 ± 3,48	85,7 ± 1,31	85,7 ± 1,31	88,3 ± 1,27	85,2 ± 1,24	87,1 ± 1,54	83,8 ± 3,96	83,8 ± 3,96
FC (bpm⁻¹)	0	374,5 ± 13,92	346,3 ± 20,54	346,3 ± 20,54	362,9 ± 6,07	308,4 ± 14,73	351,1 ± 16,34	377,7 ± 15,29	377,7 ± 15,29
	15	370,1 ± 14,93	338,7 ± 22,13	338,7 ± 22,13	353,6 ± 6,27	302,2 ± 13,09	349,0 ± 17,60	375,9 ± 15,16	375,9 ± 15,16
	30	366,6 ± 12,20	337,5 ± 18,87	337,5 ± 18,87	354,3 ± 5,55	301,5 ± 13,83	346,5 ± 18,04	372,5 ± 15,84	372,5 ± 15,84
	90	357,1 ± 14,83	338,2 ± 17,51	338,2 ± 17,51	354,5 ± 5,20	305,7 ± 12,68	347,1 ± 17,26	373,4 ± 15,70	373,4 ± 15,70
	300	361,6 ± 18,20	345,6 ± 19,36	345,6 ± 19,36	355,9 ± 6,18	310,9 ± 12,77	353,7 ± 16,00	372,8 ± 13,76	372,8 ± 13,76
QTc	0	116,2 ± 2,81	116,4 ± 3,04	116,4 ± 3,04	123,1 ± 2,46	123,3 ± 3,62	122,2 ± 1,07	122,1 ± 2,45	122,1 ± 2,45
	15	139,0 ± 4,14	126,2 ± 4,73	126,2 ± 4,73	138,6 ± 4,40	130,7 ± 3,58	132,7 ± 2,03	134,9 ± 3,85	134,9 ± 3,85
	30	130,3 ± 2,53	125,6 ± 4,23	125,6 ± 4,23	141,0 ± 2,40	129,5 ± 3,39	140,1 ± 2,45	134,4 ± 3,62	134,4 ± 3,62
	90	119,1 ± 2,12	122,6 ± 4,51	122,6 ± 4,51	132,8 ± 3,50	127,8 ± 3,54	128,3 ± 2,21	127,0 ± 3,50	127,0 ± 3,50
	300	117,7 ± 2,60	116,9 ± 3,21	116,9 ± 3,21	124,9 ± 3,00	124,7 ± 3,42	123,2 ± 1,00	122,2 ± 3,42	122,2 ± 3,42

Tabela 8: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 2 horas após a administração de Píridostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas
QT (ms)	0	63,4 ± 1,99	62,0 ± 1,32	67,2 ± 1,30	62,7 ± 1,77	66,9 ± 1,47	66,9 ± 1,47
	15	76,0 ± 2,87	70,3 ± 2,24	72,7 ± 1,34	77,6 ± 1,31	65,8 ± 1,51	72,5 ± 1,59
	30	71,4 ± 1,69	71,6 ± 1,90	72,5 ± 1,97	77,7 ± 0,93	67,6 ± 1,50	72,2 ± 1,45
	90	65,8 ± 1,82	67,5 ± 2,03	69,3 ± 2,04	74,0 ± 0,75	65,6 ± 1,64	70,8 ± 1,39
	300	64,8 ± 2,17	63,5 ± 1,65	68,1 ± 1,46	70,6 ± 0,70	63,8 ± 2,06	67,3 ± 1,63
PR (ms)	0	49,4 ± 0,51	46,4 ± 1,60	53,4 ± 0,93	49,9 ± 1,88	54,6 ± 1,67	42,4 ± 0,88
	15	49,8 ± 0,34	46,4 ± 1,66	53,5 ± 1,19	50,0 ± 1,89	54,0 ± 1,91	42,4 ± 0,95
	30	50,4 ± 0,28	46,2 ± 1,49	53,1 ± 1,12	49,7 ± 1,91	53,6 ± 1,90	42,5 ± 0,93
	90	50,3 ± 0,32	46,7 ± 1,66	53,6 ± 0,88	50,2 ± 2,04	54,8 ± 1,75	42,8 ± 0,77
	300	49,1 ± 0,42	46,3 ± 1,64	53,1 ± 0,92	49,9 ± 1,91	53,4 ± 1,21	42,4 ± 0,90
QRS (ms)	0	24,1 ± 0,80	21,4 ± 0,84	25,8 ± 0,98	22,1 ± 0,50	24,7 ± 0,65	22,8 ± 0,24
	15	23,8 ± 0,74	21,4 ± 0,97	25,6 ± 0,89	22,2 ± 0,32	24,7 ± 0,51	23,1 ± 0,24
	30	24,2 ± 0,60	21,3 ± 0,85	25,7 ± 0,77	22,2 ± 0,35	24,7 ± 0,38	23,2 ± 0,23
	90	24,3 ± 0,64	21,2 ± 0,79	25,7 ± 0,80	22,4 ± 0,40	24,8 ± 0,36	22,9 ± 0,24
	300	24,0 ± 0,76	21,3 ± 0,87	25,4 ± 0,82	21,9 ± 0,36	25,1 ± 0,44	22,9 ± 0,23
PAS (mmHg)	0	123,5 ± 6,34	126,1 ± 3,35	126,5 ± 2,41	119,2 ± 5,55	125,7 ± 1,66	124,4 ± 3,72
	15	189,6 ± 7,47	173,9 ± 13,89	170,5 ± 6,03	157,1 ± 6,30	172,5 ± 5,86	153,8 ± 4,62
	30	179,9 ± 8,81	169,2 ± 10,83	164,7 ± 2,33	150,6 ± 3,81	172,9 ± 6,27	155,5 ± 3,23
	90	149,7 ± 9,22	145,5 ± 11,67	155,5 ± 3,23	140,5 ± 4,60	160,8 ± 7,30	136,5 ± 7,04
	300	120,6 ± 4,74	122,8 ± 5,53	129,9 ± 1,56	119,5 ± 5,78	129,2 ± 1,54	124,1 ± 4,27
PAD (mmHg)	0	85,7 ± 3,60	80,3 ± 4,43	86,9 ± 1,43	79,3 ± 5,54	82,7 ± 2,58	73,4 ± 3,45
	15	129,3 ± 3,30	115,5 ± 12,41	125,3 ± 6,35	111,5 ± 5,96	123,7 ± 4,75	95,5 ± 3,75
	30	123,6 ± 6,15	117,2 ± 10,45	122,1 ± 2,54	103,0 ± 4,75	122,6 ± 6,03	99,0 ± 3,24
	90	99,6 ± 8,13	95,6 ± 8,82	111,1 ± 3,71	94,8 ± 5,57	111,0 ± 7,34	84,8 ± 4,14
	300	84,0 ± 3,48	78,3 ± 4,73	87,2 ± 1,66	78,7 ± 5,81	82,7 ± 2,82	72,5 ± 2,75
FC (bpm⁻¹)	0	374,5 ± 13,92	378,0 ± 10,31	351,6 ± 13,59	322,6 ± 14,68	320,3 ± 18,84	340,5 ± 14,06
	15	370,1 ± 14,93	372,2 ± 8,92	353,6 ± 12,92	316,2 ± 15,03	317,0 ± 20,49	328,6 ± 14,12
	30	366,6 ± 12,20	365,2 ± 7,78	354,2 ± 11,68	312,5 ± 14,47	326,4 ± 16,67	324,1 ± 16,20
	90	357,1 ± 14,83	368,8 ± 9,91	351,1 ± 13,01	316,1 ± 14,33	326,6 ± 15,68	329,3 ± 14,27
	300	361,6 ± 18,20	375,4 ± 11,79	355,1 ± 13,44	319,0 ± 12,98	328,0 ± 17,52	330,7 ± 15,92
QTc	0	116,2 ± 2,81	114,4 ± 2,22	120,5 ± 1,97	121,6 ± 2,64	109,3 ± 2,62	119,1 ± 2,09
	15	139,0 ± 4,14	129,1 ± 3,71	130,9 ± 2,59	134,8 ± 3,07	113,9 ± 2,07	127,6 ± 2,43
	30	130,3 ± 2,53	130,6 ± 3,19	130,7 ± 2,99	134,4 ± 2,43	118,5 ± 2,35	126,4 ± 2,33
	90	119,1 ± 2,12	123,4 ± 3,32	124,5 ± 2,83	128,6 ± 1,85	115,1 ± 2,69	124,5 ± 2,73
	300	117,7 ± 2,60	116,8 ± 2,47	122,8 ± 2,15	123,1 ± 1,62	111,8 ± 2,94	117,9 ± 2,71

Tabela 9: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 4 horas após a administração de Píridostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Controle		Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Controle	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas
QT (ms)	0	63,4 ± 1,99	64,9 ± 1,82	65,4 ± 2,05	68,9 ± 0,30				
	15	76,0 ± 2,87	73,5 ± 3,04	73,7 ± 3,04	76,1 ± 0,49				
	30	71,4 ± 1,69	75,5 ± 1,92	75,3 ± 1,94	76,4 ± 0,80				
	90	65,8 ± 1,82	68,9 ± 2,70	68,9 ± 2,80	72,8 ± 0,79				
	300	64,8 ± 2,17	65,7 ± 2,23	65,7 ± 2,25	69,2 ± 0,33				
PR (ms)	0	49,4 ± 0,51	47,0 ± 1,43	47,2 ± 1,18	46,1 ± 1,32				
	15	49,8 ± 0,34	47,1 ± 1,45	47,5 ± 1,07	45,9 ± 1,40				
	30	50,4 ± 0,28	47,3 ± 1,40	47,0 ± 0,99	45,9 ± 1,40				
	90	50,3 ± 0,32	47,3 ± 1,40	47,6 ± 1,11	46,5 ± 1,46				
	300	49,1 ± 0,42	47,0 ± 1,44	47,3 ± 1,18	46,2 ± 1,39				
QRS (ms)	0	24,1 ± 0,80	21,9 ± 0,35	21,8 ± 0,25	21,1 ± 0,36				
	15	23,8 ± 0,74	22,1 ± 0,33	22,1 ± 0,25	20,9 ± 0,31				
	30	24,2 ± 0,60	22,2 ± 0,35	22,2 ± 0,25	20,9 ± 0,36				
	90	24,3 ± 0,64	22,0 ± 0,33	22,0 ± 0,23	21,0 ± 0,33				
	300	24,0 ± 0,76	22,0 ± 0,38	21,9 ± 0,27	21,0 ± 0,32				
PAS (mmHg)	0	123,5 ± 6,34	123,9 ± 2,41	128,9 ± 2,01	128,4 ± 2,70				
	15	189,6 ± 7,47	192,6 ± 8,10	189,6 ± 6,84	184,5 ± 9,86				
	30	179,9 ± 8,81	187,0 ± 8,88	187,0 ± 7,01	173,2 ± 6,59				
	90	149,7 ± 9,22	150,9 ± 8,30	159,0 ± 7,22	155,2 ± 4,70				
	300	120,6 ± 4,74	126,3 ± 1,89	131,2 ± 2,01	129,3 ± 2,29				
PAD (mmHg)	0	85,7 ± 3,60	85,9 ± 2,29	86,5 ± 0,93	84,0 ± 1,86				
	15	129,3 ± 3,30	143,1 ± 7,56	136,0 ± 4,18	130,0 ± 7,88				
	30	123,6 ± 6,15	134,6 ± 8,53	132,2 ± 5,17	120,1 ± 4,85				
	90	99,6 ± 8,13	106,0 ± 7,28	108,2 ± 6,53	102,7 ± 3,43				
	300	84,0 ± 3,48	86,8 ± 2,01	86,3 ± 1,08	86,5 ± 2,50				
FC (bpm⁻¹)	0	374,5 ± 13,92	384,2 ± 24,55	409,8 ± 15,48	376,6 ± 12,96				
	15	370,1 ± 14,93	373,5 ± 26,79	406,8 ± 13,47	374,6 ± 10,94				
	30	366,6 ± 12,20	377,2 ± 29,29	412,5 ± 15,68	380,5 ± 9,45				
	90	357,1 ± 14,83	378,3 ± 26,87	408,1 ± 15,62	383,3 ± 8,77				
	300	361,6 ± 18,20	381,2 ± 23,57	409,6 ± 12,42	383,3 ± 14,61				
QTc	0	116,2 ± 2,81	120,0 ± 4,13	124,1 ± 4,95	126,7 ± 1,31				
	15	139,0 ± 4,14	134,7 ± 6,53	139,6 ± 6,43	140,1 ± 2,00				
	30	130,3 ± 2,53	138,7 ± 5,38	143,3 ± 4,97	141,3 ± 1,86				
	90	119,1 ± 2,12	126,8 ± 6,13	130,6 ± 6,31	135,0 ± 1,44				
	300	117,7 ± 2,60	121,2 ± 4,78	124,7 ± 5,08	128,4 ± 1,36				

Tabela 10: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 1 µg de NA, 6 horas após a administração de Pirodostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Controle		Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Controle	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas		
QT (ms)	0	63,4 ± 1,99	66,4 ± 1,61	64,7 ± 1,39	62,6 ± 1,48				
	15	76,0 ± 2,87	77,3 ± 1,92	69,5 ± 1,92	67,0 ± 1,79				
	30	71,4 ± 1,69	76,6 ± 1,62	70,7 ± 1,77	67,1 ± 1,63				
	90	65,8 ± 1,82	72,5 ± 2,09	67,1 ± 2,11	65,7 ± 1,80				
PR (ms)	0	64,8 ± 2,17	67,6 ± 1,81	64,5 ± 1,41	63,2 ± 1,69				
	15	49,4 ± 0,51	45,5 ± 1,51	45,4 ± 0,99	45,0 ± 1,68				
	30	49,8 ± 0,34	45,9 ± 1,54	45,2 ± 1,10	44,8 ± 1,67				
	90	50,4 ± 0,28	45,4 ± 1,43	45,4 ± 0,98	44,6 ± 1,51				
QRS (ms)	0	50,3 ± 0,32	46,4 ± 1,62	45,6 ± 1,15	45,0 ± 1,58				
	15	49,1 ± 0,42	45,6 ± 1,52	45,2 ± 1,01	44,9 ± 1,68				
	30	24,1 ± 0,80	22,3 ± 0,35	21,0 ± 0,79	21,3 ± 0,88				
	90	23,8 ± 0,74	22,5 ± 0,24	20,9 ± 0,86	21,3 ± 0,88				
PAS (mmHg)	0	24,2 ± 0,60	22,7 ± 0,31	21,0 ± 0,81	21,5 ± 0,92				
	15	24,3 ± 0,64	22,5 ± 0,35	20,9 ± 0,77	21,5 ± 0,92				
	30	24,0 ± 0,76	22,3 ± 0,38	21,0 ± 0,80	21,4 ± 0,90				
	90	123,5 ± 6,34	127,1 ± 1,11	128,3 ± 0,91	126,6 ± 1,60				
PAD (mmHg)	0	189,6 ± 7,47	169,2 ± 6,45	164,2 ± 3,02	192,8 ± 7,30				
	15	179,9 ± 8,81	160,1 ± 2,57	160,5 ± 4,46	189,3 ± 7,91				
	30	149,7 ± 9,22	147,7 ± 4,79	146,0 ± 3,28	155,0 ± 7,57				
	90	120,6 ± 4,74	131,1 ± 0,77	129,1 ± 1,75	128,6 ± 1,67				
FC (bpm⁻¹)	0	85,7 ± 3,60	85,5 ± 1,80	87,3 ± 2,24	87,4 ± 2,36				
	15	129,3 ± 3,30	120,6 ± 6,75	116,1 ± 4,45	143,0 ± 6,62				
	30	123,6 ± 6,15	112,3 ± 3,64	114,0 ± 6,39	137,7 ± 7,17				
	90	99,6 ± 8,13	100,8 ± 5,13	99,0 ± 4,63	108,7 ± 6,50				
QTc	0	84,0 ± 3,48	87,4 ± 1,74	88,3 ± 2,21	87,8 ± 1,67				
	15	374,5 ± 13,92	381,7 ± 14,14	365,3 ± 13,00	402,5 ± 21,62				
	30	370,1 ± 14,93	383,8 ± 13,99	365,4 ± 12,26	403,0 ± 23,32				
	90	366,6 ± 12,20	379,0 ± 12,11	363,3 ± 8,96	397,6 ± 20,49				
QTc	0	357,1 ± 14,83	377,8 ± 12,07	362,7 ± 8,42	388,9 ± 18,67				
	15	361,6 ± 18,20	381,2 ± 14,18	368,2 ± 12,64	386,4 ± 18,04				
	30	116,2 ± 2,81	122,8 ± 3,22	117,8 ± 2,32	126,7 ± 2,09				
	90	139,0 ± 4,14	143,3 ± 3,49	126,8 ± 3,30	135,6 ± 2,54				
QTc	0	130,3 ± 2,53	141,5 ± 3,33	128,6 ± 2,79	135,5 ± 2,57				
	15	119,1 ± 2,12	133,8 ± 4,02	122,1 ± 3,27	131,9 ± 2,63				
	30	117,7 ± 2,60	125,0 ± 3,51	117,3 ± 2,34	126,7 ± 2,55				
	90								

Tabela 11: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 1 hora após a administração de Piridostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Controle		Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas
QT (ms)	0	71,2 ± 0,90	70,9 ± 0,81	65,4 ± 1,69	67,0 ± 2,28	69,8 ± 1,35	67,0 ± 2,28	69,01 ± 0,82	69,01 ± 0,82
	15	84,5 ± 1,68	80,7 ± 1,49	72,8 ± 2,34	76,1 ± 1,61	76,9 ± 3,02	77,16 ± 1,37	77,16 ± 1,37	77,16 ± 1,37
	30	85,0 ± 1,52	78,5 ± 1,54	73,3 ± 1,84	75,8 ± 1,46	76,3 ± 2,94	78,83 ± 0,78	78,83 ± 0,78	78,83 ± 0,78
	90	80,6 ± 1,50	74,0 ± 1,90	69,0 ± 2,22	74,1 ± 1,37	71,6 ± 2,73	74,97 ± 0,44	74,97 ± 0,44	74,97 ± 0,44
	300	73,3 ± 1,20	71,3 ± 1,04	65,8 ± 1,79	70,0 ± 1,36	67,8 ± 2,29	69,53 ± 0,91	69,53 ± 0,91	69,53 ± 0,91
PR (ms)	0	46,7 ± 0,92	45,6 ± 1,52	47,4 ± 1,50	46,0 ± 1,57	45,7 ± 1,89	46,6 ± 1,38	46,6 ± 1,38	46,6 ± 1,38
	15	49,4 ± 0,99	45,4 ± 1,60	47,6 ± 1,47	46,0 ± 1,37	45,8 ± 1,87	47,1 ± 1,45	47,1 ± 1,45	47,1 ± 1,45
	30	48,6 ± 1,07	45,8 ± 1,61	47,1 ± 1,41	46,0 ± 1,37	45,8 ± 1,75	47,2 ± 1,34	47,2 ± 1,34	47,2 ± 1,34
	90	48,6 ± 0,89	46,1 ± 1,68	47,8 ± 1,43	46,0 ± 1,39	46,0 ± 1,75	48,0 ± 1,55	48,0 ± 1,55	48,0 ± 1,55
	300	47,0 ± 0,89	45,3 ± 1,50	47,4 ± 1,50	46,1 ± 1,54	45,6 ± 1,87	46,9 ± 1,43	46,9 ± 1,43	46,9 ± 1,43
QRS (ms)	0	22,4 ± 0,87	23,1 ± 0,93	21,9 ± 0,40	21,5 ± 0,52	23,3 ± 0,76	21,9 ± 0,39	21,9 ± 0,39	21,9 ± 0,39
	15	23,5 ± 0,86	23,1 ± 0,82	22,0 ± 0,40	21,9 ± 0,51	23,3 ± 0,84	22,1 ± 0,33	22,1 ± 0,33	22,1 ± 0,33
	30	23,6 ± 1,02	23,3 ± 0,89	22,0 ± 0,46	21,8 ± 0,63	23,5 ± 0,82	22,4 ± 0,35	22,4 ± 0,35	22,4 ± 0,35
	90	22,9 ± 0,76	23,2 ± 0,78	21,8 ± 0,40	21,5 ± 0,62	23,2 ± 0,73	22,0 ± 0,34	22,0 ± 0,34	22,0 ± 0,34
	300	22,5 ± 0,84	23,1 ± 0,98	21,9 ± 0,37	21,5 ± 0,46	23,2 ± 0,69	21,8 ± 0,42	21,8 ± 0,42	21,8 ± 0,42
PAS (mmHg)	0	124,9 ± 2,42	126,8 ± 3,52	125,0 ± 2,91	126,5 ± 2,49	128,3 ± 1,49	124,5 ± 1,22	124,5 ± 1,22	124,5 ± 1,22
	15	215,6 ± 7,37	201,1 ± 13,55	192,5 ± 6,64	187,2 ± 9,56	214,9 ± 11,44	193,7 ± 9,75	193,7 ± 9,75	193,7 ± 9,75
	30	194,8 ± 3,18	187,0 ± 13,62	183,4 ± 5,91	175,5 ± 7,20	204,8 ± 10,54	189,9 ± 5,66	189,9 ± 5,66	189,9 ± 5,66
	90	141,3 ± 9,98	166,3 ± 13,06	167,1 ± 4,20	151,1 ± 11,43	170,2 ± 5,37	169,6 ± 5,48	169,6 ± 5,48	169,6 ± 5,48
	300	126,5 ± 2,13	130,6 ± 4,48	128,8 ± 4,83	123,9 ± 6,76	130,3 ± 3,14	129,5 ± 3,13	129,5 ± 3,13	129,5 ± 3,13
PAD (mmHg)	0	86,3 ± 1,82	82,3 ± 2,49	83,7 ± 4,11	87,7 ± 1,52	85,6 ± 1,07	88,1 ± 1,93	88,1 ± 1,93	88,1 ± 1,93
	15	145,2 ± 2,18	142,4 ± 10,94	139,8 ± 5,90	142,2 ± 6,06	154,6 ± 7,49	140,4 ± 7,85	140,4 ± 7,85	140,4 ± 7,85
	30	133,3 ± 2,59	131,2 ± 12,45	133,0 ± 4,05	128,5 ± 4,62	147,6 ± 5,43	141,2 ± 4,06	141,2 ± 4,06	141,2 ± 4,06
	90	101,9 ± 8,98	118,1 ± 9,18	118,0 ± 4,24	108,1 ± 8,69	120,9 ± 4,74	121,1 ± 4,71	121,1 ± 4,71	121,1 ± 4,71
	300	86,2 ± 2,40	87,4 ± 3,03	85,6 ± 5,12	86,6 ± 3,47	87,0 ± 1,73	89,6 ± 2,26	89,6 ± 2,26	89,6 ± 2,26
FC (bpm ⁻¹)	0	389,4 ± 12,35	368,2 ± 10,94	373,3 ± 10,09	344,3 ± 14,90	417,8 ± 18,79	329,4 ± 10,01	329,4 ± 10,01	329,4 ± 10,01
	15	332,8 ± 29,10	357,5 ± 12,80	342,5 ± 10,94	321,1 ± 25,07	379,4 ± 26,55	306,0 ± 13,55	306,0 ± 13,55	306,0 ± 13,55
	30	353,4 ± 23,64	361,2 ± 11,46	360,6 ± 9,21	312,7 ± 26,25	388,4 ± 21,12	293,1 ± 17,31	293,1 ± 17,31	293,1 ± 17,31
	90	372,9 ± 16,11	360,6 ± 9,83	366,2 ± 8,19	332,1 ± 20,62	400,7 ± 19,98	307,1 ± 14,25	307,1 ± 14,25	307,1 ± 14,25
	300	380,8 ± 12,11	369,7 ± 13,45	371,9 ± 10,30	335,1 ± 17,24	417,0 ± 19,29	328,4 ± 10,57	328,4 ± 10,57	328,4 ± 10,57
QTc	0	132,4 ± 1,35	129,5 ± 2,01	119,9 ± 2,59	124,9 ± 3,11	127,5 ± 3,69	121,6 ± 2,11	121,6 ± 2,11	121,6 ± 2,11
	15	148,0 ± 5,14	146,2 ± 3,20	129,9 ± 3,88	132,6 ± 4,74	140,9 ± 4,33	132,6 ± 2,80	132,6 ± 2,80	132,6 ± 2,80
	30	152,6 ± 3,88	142,7 ± 3,66	133,1 ± 2,82	130,7 ± 4,91	141,3 ± 3,90	133,5 ± 3,58	133,5 ± 3,58	133,5 ± 3,58
	90	147,7 ± 2,06	134,5 ± 4,30	125,8 ± 3,36	130,6 ± 3,62	134,1 ± 4,11	129,0 ± 2,15	129,0 ± 2,15	129,0 ± 2,15
	300	135,5 ± 1,66	129,4 ± 3,86	120,7 ± 2,63	124,0 ± 2,92	129,0 ± 3,86	122,4 ± 1,91	122,4 ± 1,91	122,4 ± 1,91

Tabela 12: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 2 horas após a administração de Pirodostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Controle		Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas	Livre	Lipossomas
QT (ms)	0	71,2 ± 0,90	66,8 ± 2,08	71,4 ± 0,98	66,8 ± 2,08	68,3 ± 1,18	66,9 ± 1,65	67,9 ± 1,26	67,9 ± 1,26
	15	84,5 ± 1,68	75,4 ± 2,69	84,9 ± 1,60	75,4 ± 2,69	74,5 ± 2,04	75,9 ± 2,62	73,9 ± 1,58	73,9 ± 1,58
	30	85,0 ± 1,52	76,2 ± 2,92	80,4 ± 1,03	76,2 ± 2,92	76,2 ± 1,37	75,1 ± 1,97	73,6 ± 1,53	73,6 ± 1,53
	90	80,6 ± 1,50	77,2 ± 2,08	77,2 ± 0,89	70,5 ± 2,08	73,0 ± 1,71	71,1 ± 2,29	71,2 ± 1,39	71,2 ± 1,39
300	73,3 ± 1,20	72,4 ± 1,89	72,4 ± 1,06	67,0 ± 1,89	68,9 ± 1,92	67,0 ± 1,82	68,1 ± 1,28	68,1 ± 1,28	
PR (ms)	0	46,7 ± 0,92	45,8 ± 2,02	45,8 ± 2,02	46,0 ± 1,91	45,4 ± 1,82	46,3 ± 1,69	46,6 ± 1,39	46,6 ± 1,39
	15	49,4 ± 0,99	46,3 ± 2,12	46,3 ± 2,12	45,9 ± 1,96	45,6 ± 1,76	46,2 ± 1,68	46,5 ± 1,41	46,5 ± 1,41
	30	48,6 ± 1,07	45,8 ± 1,89	45,8 ± 1,89	45,9 ± 1,81	45,0 ± 1,84	45,9 ± 1,58	46,2 ± 1,24	46,2 ± 1,24
	90	48,6 ± 0,89	46,5 ± 1,89	46,5 ± 1,89	46,3 ± 1,82	46,1 ± 1,74	46,5 ± 1,56	46,3 ± 1,19	46,3 ± 1,19
300	47,0 ± 0,89	45,3 ± 1,88	45,3 ± 1,88	45,9 ± 1,94	45,2 ± 1,80	45,9 ± 1,62	46,9 ± 1,40	46,9 ± 1,40	
QRS (ms)	0	22,4 ± 0,87	24,8 ± 1,24	24,8 ± 1,24	22,1 ± 0,46	22,5 ± 0,35	21,9 ± 0,43	21,4 ± 0,52	21,4 ± 0,52
	15	23,5 ± 0,86	25,0 ± 1,41	25,0 ± 1,41	22,2 ± 0,47	22,6 ± 0,41	22,3 ± 0,34	21,7 ± 0,46	21,7 ± 0,46
	30	23,6 ± 1,02	24,9 ± 1,25	24,9 ± 1,25	22,2 ± 0,49	22,7 ± 0,38	22,2 ± 0,40	21,5 ± 0,47	21,5 ± 0,47
	90	22,9 ± 0,76	24,9 ± 1,28	24,9 ± 1,28	22,2 ± 0,47	22,5 ± 0,37	21,9 ± 0,38	21,2 ± 0,52	21,2 ± 0,52
300	22,5 ± 0,84	24,6 ± 1,26	24,6 ± 1,26	22,2 ± 0,47	22,4 ± 0,30	21,8 ± 0,42	21,5 ± 0,50	21,5 ± 0,50	
PAS (mmHg)	0	124,9 ± 2,42	112,1 ± 5,50	112,1 ± 5,50	122,8 ± 2,09	124,1 ± 2,93	124,6 ± 2,89	125,1 ± 2,33	125,1 ± 2,33
	15	215,6 ± 7,37	151,0 ± 5,87	151,0 ± 5,87	172,4 ± 6,11	184,8 ± 7,87	195,6 ± 5,06	171,9 ± 6,29	171,9 ± 6,29
	30	194,8 ± 3,18	138,8 ± 4,10	138,8 ± 4,10	168,6 ± 7,37	185,9 ± 3,78	183,6 ± 2,58	172,5 ± 1,78	172,5 ± 1,78
	90	141,3 ± 9,98	123,5 ± 7,98	123,5 ± 7,98	142,4 ± 9,79	173,4 ± 5,39	161,7 ± 5,42	150,9 ± 2,04	150,9 ± 2,04
300	126,5 ± 2,13	119,1 ± 4,52	119,1 ± 4,52	121,3 ± 3,30	126,0 ± 4,65	125,0 ± 4,15	123,3 ± 3,18	123,3 ± 3,18	
PAD (mmHg)	0	86,3 ± 1,82	76,6 ± 4,51	76,6 ± 4,51	79,1 ± 3,80	87,4 ± 2,37	82,9 ± 4,12	92,5 ± 2,32	92,5 ± 2,32
	15	145,2 ± 2,18	101,6 ± 5,39	101,6 ± 5,39	119,7 ± 4,56	134,7 ± 6,42	145,5 ± 3,77	131,2 ± 8,55	131,2 ± 8,55
	30	133,3 ± 2,59	87,2 ± 3,40	87,2 ± 3,40	112,6 ± 6,23	131,0 ± 1,91	133,6 ± 1,17	138,0 ± 3,89	138,0 ± 3,89
	90	101,9 ± 8,98	76,7 ± 7,22	76,7 ± 7,22	92,3 ± 8,31	126,9 ± 2,59	113,7 ± 5,67	110,6 ± 4,64	110,6 ± 4,64
300	86,2 ± 2,40	77,4 ± 4,26	77,4 ± 4,26	79,5 ± 4,23	88,0 ± 3,13	83,9 ± 5,16	89,2 ± 3,59	89,2 ± 3,59	
FC (bpm⁻¹)	0	389,4 ± 12,35	331,7 ± 7,51	331,7 ± 7,51	357,6 ± 21,25	356,9 ± 12,94	361,0 ± 4,99	397,2 ± 11,15	397,2 ± 11,15
	15	332,8 ± 29,10	326,9 ± 6,73	326,9 ± 6,73	344,8 ± 22,77	325,3 ± 21,62	325,1 ± 15,03	382,1 ± 18,74	382,1 ± 18,74
	30	353,4 ± 23,64	321,8 ± 8,44	321,8 ± 8,44	340,3 ± 21,91	301,4 ± 25,22	334,5 ± 16,41	381,5 ± 20,26	381,5 ± 20,26
	90	372,9 ± 16,11	323,6 ± 9,13	323,6 ± 9,13	348,2 ± 22,71	334,3 ± 23,94	345,6 ± 8,77	394,6 ± 13,55	394,6 ± 13,55
300	380,8 ± 12,11	327,8 ± 8,81	327,8 ± 8,81	360,3 ± 19,38	360,4 ± 13,02	357,0 ± 4,17	394,0 ± 11,47	394,0 ± 11,47	
QTc	0	132,4 ± 1,35	126,0 ± 1,81	126,0 ± 1,81	120,7 ± 3,99	123,5 ± 3,11	121,8 ± 3,00	115,3 ± 1,70	115,3 ± 1,70
	15	148,0 ± 5,14	149,5 ± 3,15	149,5 ± 3,15	134,8 ± 5,69	130,4 ± 4,70	132,8 ± 3,89	123,2 ± 2,27	123,2 ± 2,27
	30	152,6 ± 3,88	140,6 ± 2,27	140,6 ± 2,27	135,5 ± 6,30	129,8 ± 5,29	132,7 ± 3,54	122,5 ± 2,21	122,5 ± 2,21
	90	147,7 ± 2,06	134,8 ± 1,86	134,8 ± 1,86	126,6 ± 5,48	128,8 ± 4,23	127,3 ± 3,72	120,5 ± 1,27	120,5 ± 1,27
300	135,5 ± 1,66	125,4 ± 3,65	125,4 ± 3,65	121,6 ± 4,11	125,0 ± 3,46	121,4 ± 3,39	115,4 ± 1,31	115,4 ± 1,31	

Tabela 13: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 4 horas após a administração de Pirodostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Controle		Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Controle	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas	Lipossomas
QT (ms)	0	71,2 ± 0,90	67,9 ± 1,34	66,3 ± 1,80	64,7 ± 0,88				
	15	84,5 ± 1,68	77,8 ± 2,46	74,2 ± 2,81	70,5 ± 1,27				
	30	85,0 ± 1,52	78,1 ± 1,24	75,7 ± 2,40	71,1 ± 0,91				
	90	80,6 ± 1,50	73,5 ± 2,08	70,4 ± 2,33	66,7 ± 1,32				
	300	73,3 ± 1,20	69,1 ± 1,65	66,7 ± 1,93	65,0 ± 1,17				
PR (ms)	0	46,7 ± 0,92	46,0 ± 1,33	46,1 ± 1,95	44,6 ± 0,67				
	15	49,4 ± 0,99	46,4 ± 1,39	45,9 ± 1,92	44,3 ± 0,79				
	30	48,6 ± 1,07	45,8 ± 1,36	45,9 ± 1,75	44,5 ± 0,74				
	90	48,6 ± 0,89	46,8 ± 1,47	46,3 ± 1,84	44,5 ± 0,67				
	300	47,0 ± 0,89	46,2 ± 1,37	45,9 ± 1,95	44,4 ± 0,71				
QRS (ms)	0	22,4 ± 0,87	22,1 ± 0,37	22,2 ± 0,44	20,8 ± 0,75				
	15	23,5 ± 0,86	22,1 ± 0,22	22,3 ± 0,48	20,8 ± 0,86				
	30	23,6 ± 1,02	22,6 ± 0,32	22,3 ± 0,46	21,0 ± 0,79				
	90	22,9 ± 0,76	22,1 ± 0,20	22,2 ± 0,44	20,8 ± 0,75				
	300	22,5 ± 0,84	22,1 ± 0,38	22,2 ± 0,45	20,8 ± 0,77				
PAS (mmHg)	0	124,9 ± 2,42	121,7 ± 0,87	124,3 ± 2,74	124,1 ± 1,52				
	15	215,6 ± 7,37	186,7 ± 12,48	189,7 ± 9,45	217,6 ± 13,99				
	30	194,8 ± 3,18	179,8 ± 11,59	172,2 ± 6,91	207,5 ± 11,93				
	90	141,3 ± 9,98	150,1 ± 8,09	153,1 ± 11,29	162,3 ± 3,65				
	300	126,5 ± 2,13	125,7 ± 0,64	123,3 ± 5,52	127,1 ± 1,50				
PAD (mmHg)	0	86,3 ± 1,82	85,7 ± 1,35	87,9 ± 1,29	84,0 ± 1,20				
	15	145,2 ± 2,18	132,5 ± 9,14	143,8 ± 6,16	155,9 ± 11,03				
	30	133,3 ± 2,59	123,3 ± 8,63	128,4 ± 4,74	146,5 ± 7,76				
	90	101,9 ± 8,98	101,0 ± 8,93	113,1 ± 8,08	110,1 ± 1,69				
	300	86,2 ± 2,40	84,8 ± 1,57	87,4 ± 3,41	85,2 ± 1,82				
FC (bpm⁻¹)	0	389,4 ± 12,35	423,3 ± 16,39	399,8 ± 11,35	383,1 ± 10,20				
	15	332,8 ± 29,10	392,3 ± 17,95	368,8 ± 12,52	344,0 ± 24,22				
	30	353,4 ± 23,64	389,2 ± 19,58	383,8 ± 14,16	351,9 ± 17,22				
	90	372,9 ± 16,11	406,6 ± 23,63	383,8 ± 10,10	369,4 ± 10,54				
	300	380,8 ± 12,11	419,6 ± 17,28	393,5 ± 10,90	377,6 ± 14,70				
QTc	0	132,4 ± 1,35	129,9 ± 2,62	124,6 ± 4,11	129,4 ± 1,29				
	15	148,0 ± 5,14	145,0 ± 4,65	135,8 ± 5,49	137,0 ± 4,13				
	30	152,6 ± 3,88	145,2 ± 2,90	140,4 ± 4,70	139,1 ± 3,05				
	90	147,7 ± 2,06	138,6 ± 4,28	130,6 ± 4,21	132,3 ± 1,84				
	300	135,5 ± 1,66	131,9 ± 3,25	124,8 ± 4,26	129,1 ± 2,13				

Tabela 14: Valores absolutos dos parâmetros do ECG e PA após administração de IV de 3 µg de NA, 6 horas após a administração de Pirodostigmina em diferentes doses.

Parâmetro	Tempo (seg)	Controle		Pir 0,1 mg/kg		Pir 0,3 mg/kg		Pir 1,0 mg/kg	
		Lipossomas		Lipossomas		Lipossomas		Lipossomas	
QT (ms)	0	71,2 ± 0,90	65,7 ± 1,88	65,1 ± 2,11	65,9 ± 1,96				
	15	84,5 ± 1,68	74,6 ± 2,54	72,9 ± 3,18	72,5 ± 2,38				
	30	85,0 ± 1,52	78,5 ± 2,31	75,3 ± 1,90	75,6 ± 1,60				
	90	80,6 ± 1,50	72,2 ± 3,50	68,9 ± 2,59	69,9 ± 2,18				
	300	73,3 ± 1,20	66,6 ± 2,32	65,8 ± 2,22	65,8 ± 1,81				
PR (ms)	0	46,7 ± 0,92	47,8 ± 0,97	46,9 ± 1,45	47,4 ± 1,42				
	15	49,4 ± 0,99	48,5 ± 0,60	47,2 ± 1,47	47,4 ± 1,50				
	30	48,6 ± 1,07	48,0 ± 0,77	46,7 ± 1,26	47,2 ± 1,33				
	90	48,6 ± 0,89	49,1 ± 0,85	47,4 ± 1,40	48,1 ± 1,51				
	300	47,0 ± 0,89	48,0 ± 1,02	46,9 ± 1,45	47,3 ± 1,44				
QRS (ms)	0	22,4 ± 0,87	21,6 ± 0,31	21,9 ± 0,35	22,3 ± 0,32				
	15	23,5 ± 0,86	21,8 ± 0,16	22,1 ± 0,35	22,3 ± 0,29				
	30	23,6 ± 1,02	21,8 ± 0,24	22,3 ± 0,33	22,4 ± 0,31				
	90	22,9 ± 0,76	21,6 ± 0,18	22,0 ± 0,32	22,2 ± 0,30				
	300	22,5 ± 0,84	21,8 ± 0,28	21,9 ± 0,37	22,3 ± 0,26				
PAS (mmHg)	0	124,9 ± 2,42	127,4 ± 2,32	125,9 ± 4,29	126,8 ± 2,57				
	15	215,6 ± 7,37	203,4 ± 12,10	175,1 ± 10,80	213,2 ± 7,76				
	30	194,8 ± 3,18	199,5 ± 7,40	162,1 ± 9,20	210,2 ± 3,45				
	90	141,3 ± 9,98	169,6 ± 7,94	147,2 ± 7,83	171,6 ± 9,16				
	300	126,5 ± 2,13	126,2 ± 5,57	128,4 ± 4,20	122,5 ± 6,64				
PAD (mmHg)	0	86,3 ± 1,82	87,4 ± 2,08	86,3 ± 3,03	85,7 ± 0,55				
	15	145,2 ± 2,18	145,5 ± 9,62	126,9 ± 9,74	155,6 ± 4,82				
	30	133,3 ± 2,59	144,6 ± 4,87	112,3 ± 8,38	150,6 ± 2,24				
	90	101,9 ± 8,98	120,3 ± 5,80	100,9 ± 7,32	124,3 ± 5,62				
	300	86,2 ± 2,40	86,3 ± 3,69	87,6 ± 3,14	82,2 ± 3,70				
FC (bpm⁻¹)	0	389,4 ± 12,35	352,8 ± 9,79	366,2 ± 17,78	396,0 ± 6,69				
	15	332,8 ± 29,10	316,7 ± 14,53	343,7 ± 19,53	374,5 ± 11,37				
	30	353,4 ± 23,64	306,3 ± 22,76	336,1 ± 25,29	338,0 ± 20,73				
	90	372,9 ± 16,11	336,6 ± 12,16	353,8 ± 20,13	388,4 ± 3,34				
	300	380,8 ± 12,11	353,5 ± 10,44	364,6 ± 18,65	403,9 ± 2,13				
QTc	0	132,4 ± 1,35	118,1 ± 2,67	118,6 ± 3,32	123,5 ± 3,06				
	15	148,0 ± 5,14	129,3 ± 3,14	130,0 ± 5,28	133,1 ± 3,32				
	30	152,6 ± 3,88	134,1 ± 3,70	132,9 ± 3,02	133,1 ± 4,85				
	90	147,7 ± 2,06	127,9 ± 5,46	123,9 ± 4,11	130,2 ± 3,90				
	300	135,5 ± 1,66	120,0 ± 3,44	119,5 ± 3,49	124,3 ± 3,41				

12. DISCUSSÃO

12.1. Caracterização da preparação de lipossomas

A eficiência de encapsulação da Piridostigmina nos lipossomas obtida no presente trabalho pode ser considerada satisfatória, tendo em vista a encapsulação de outras substâncias ativas pelo mesmo método. De Melo e colaboradores (2003), por exemplo, obtiveram um percentual médio de encapsulação de 6,5% para o tartarato emético. Em estudos para o desenvolvimento de lipossomas contendo ácidos nucléicos, Monnard e colaboradores (1997) mostraram que a eficiência de encapsulação poderia variar de 10 a 54%, dependendo da dimensão dos lipossomas, do peso molecular das moléculas encapsuladas e do procedimento de preparação das vesículas. Dentre as técnicas utilizadas, o método de congelamento/descongelamento mostrou-se o mais eficiente, sendo as moléculas de baixo peso molecular mais eficientemente encapsuladas em lipossomas unilamelares grandes (200 nm). Outro fator que pode influenciar a eficiência de encapsulação é a composição lipídica das vesículas. Como mostrado por Crosasso e colaboradores (2000) na preparação de lipossomas contendo paclitaxel, a adição de colesterol à formulação, embora exerça um papel importante no prolongamento da meia-vida dos lipossomas no sangue e previna a liberação do fármaco a partir dos mesmos, é um fator que pode diminuir a sua eficiência de encapsulação nas vesículas.

Em relação à estabilidade da formulação, os lipossomas contendo Piridostigmina quando armazenados a 4°C conservaram por sete dias 95% da substância ativa em seu interior, indicando que sua eficácia pode ser mantida para a utilização da preparação neste período de tempo. Assim, nos experimentos realizados no presente trabalho, a formulação foi utilizada somente até uma semana após o preparo, visando a confiabilidade dos resultados obtidos.

A análise do perfil de liberação *in vitro* mostrou a habilidade dos lipossomas reterem a Piridostigmina por até 4 horas de incubação a 37°C, com liberação gradual a partir deste tempo. Nos animais que receberam a formulação lipossomal, os efeitos da Piridostigmina foram observados a partir de 2 horas da sua administração IV. Tal diferença pode ser atribuída à ausência, no modelo *in vitro*, de interações das vesículas com as proteínas plasmáticas e membranas celulares (Kirby, 1980) que desencadeariam a desestruturação das referidas

vesículas e/ou reconhecimento por células do sistema fagocitário, com conseqüente liberação do conteúdo das vesículas, ou seja, da Piridostigmina encapsulada.

A concentração de lipídios presente na formulação de lipossomas contendo Piridostigmina foi condizente com a quantidade de DSPC, lipídio base, utilizada na preparação dos mesmos. A relação fármaco/lipídio é um parâmetro útil para o aumento da eficiência de encapsulação das formulações quando diferentes tipos e/ou proporção de lipídios são utilizados, o que não corresponde aos objetivos do presente trabalho. Este dado pode, porém, ser útil em trabalhos futuros que visem o aumento da eficiência de encapsulação da Piridostigmina.

O tamanho das partículas obtidas foi condizente com o esperado, uma vez que as mesmas foram calibradas, no processo de extrusão, através de membranas com poros de 200 nm. O baixo índice de polidispersão obtido reflete a homogeneidade de tamanho das partículas, sendo as amostras consideradas monodispersas quando o IP é inferior a 0,3 (Hunter e Frisken, 1998).

O potencial zeta reflete a carga superficial das partículas e pode ser influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (Schaffazick e Guterres, 2003). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto, como observado nas preparações do presente trabalho, é importante para uma boa estabilidade físico-química da preparação, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (Schaffazick e Guterres, 2003). Os fosfolipídios constituintes dos lipossomas estão entre os principais componentes capazes de influenciar o potencial zeta, sendo que a adição do polímero de PEG à membrana das vesículas fornece um potencial negativo à interface, prevenindo a agregação das vesículas (Harasym *et al.*, 1995)

As características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. Quando se administram intravenosamente sistemas de lipossomas convencionais, estes são rapidamente removidos da circulação sanguínea pela ação de células do sistema fagocitário mononuclear, dificultando a chegada do fármaco ao sítio de ação e, por esta razão, a utilidade dos lipossomas foi restrita, durante certo tempo, ao

tratamento de patologias relacionadas ao sistema fagocitário do fígado e baço (Gregoriads, 1995). Diferentes estratégias foram então propostas para modificar a distribuição *in vivo* dos lipossomas, baseadas principalmente na atribuição de potencial de superfície negativo às partículas (Gacizon e Papahadjapoulos, 1988) e na redução da hidrofobicidade da superfície das partículas através da adsorção física de um polímero hidrofílico (PEG), diminuindo a ligação das partículas às proteínas plasmáticas e aumentando o tempo de circulação (Klibanov *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1991; Dos Santos *et al.*, 2007). De fato, vários estudos mostram que a incorporação de PEG à superfície lipossomal pode contribuir para o direcionamento das vesículas a sítios específicos, especialmente em situações em que ocorra menor filtração, como nos casos de câncer (Gacizon e Papahadjapoulos, 1988; Papahadjapoulos, 1991) ou de isquemia do miocárdio (Torchilin *et al.*, 1992 e 1995; Lukianov *et al.*, 2004; Takahama *et al.*, 2009).

Assim, a obtenção dos lipossomas contendo Piridostigmina no presente estudo se mostrou satisfatória e permitiu sua utilização *in vivo* para a avaliação da sua atividade cardioprotetora.

12.2. Avaliação das alterações dos parâmetros cardiovasculares em ratos Wistar submetidos à ativação simpática

O modelo de ativação simpática pela administração de NA *in bolus* IV foi utilizado no presente trabalho por induzir alterações significativas da PA e do intervalo QT do ECG, com o objetivo de simular as condições de hiperatividade simpática presentes em patologias cardiovasculares, sendo útil para a busca de alternativas terapêuticas que visem restaurar o equilíbrio entre os ramos do SNA. Este modelo, simples e de fácil execução, foi utilizado como uma alternativa frente a modelos como a estimulação central pela administração ICV de glutamato, o qual requer a utilização de um estereotáxico (Grabe-Guimarães *et al.*, 1999, Catelli *et al.*, 2003), indução de IAM por ligadura de coronária (Goldman e Raya, 1995), e infusão de substâncias que levem à hipertrofia miocárdica, como o isoproterenol (Boluyt *et al.*, 1995)

O aumento da atividade simpática, prevalente nas patologias cardiovasculares, é amplamente estudado e hoje o uso dos β -bloqueadores em coronariopatas é consenso na

prática clínica (Piegas *et al.*, 2004). Entre 1981 e 1985, foi conduzido um amplo estudo (ISIS-1, *First International Study on Infarct Survival*) envolvendo milhares de pacientes com suspeita de IAM em diversos países, o qual mostrou que o tratamento com atenolol foi capaz de reduzir em cerca de 23 % a mortalidade por DCV (Collaborative Group, 1986). Este e outros resultados favoráveis levaram à universalização da prescrição deste grupo de fármacos e sua posterior utilização em outras desordens cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca (Packer, 1986).

Embora os benefícios da melhoria da função simpática nas DCV tenham sido estabelecidos com o uso dos β -bloqueadores, estudos evidenciaram que o desequilíbrio autonômico por hiperatividade adrenérgica poderia estar acompanhada de hipoatividade vagal (Goldstein *et al.*, 1975; Porter *et al.*, 1990; Padley *et al.*, 2005; Lahiri *et al.*, 2008). Assim, vários pesquisadores definiram os benefícios da estimulação elétrica vagal em cães (Henning *et al.*, 1990), gatos (Zuanetti *et al.*, 1987), ratos (Li *et al.*, 2004) e pacientes portadores de DCV (Zamotrinsky *et al.*, 2001) e encorajaram a busca por alternativas terapêuticas que modulassem o sistema parassimpático, particularmente atuando sobre a ação da acetilcolina. Vários grupos avaliaram o efeito da utilização da escopolamina por via transdérmica, sendo que o principal efeito benéfico observado foi o aumento da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva avançada (La Rovere *et al.*, 1994; Casadei *et al.*, 1996; Venkatesh *et al.*, 1996). Tal efeito, contudo, só foi observado com baixas doses do fármaco, pois, em altas concentrações, a escopolamina passa a exercer ação bloqueadora colinérgica, limitando a realização de estudos com doses maiores e tempo prolongado (Hayano *et al.*, 1999).

Apesar de os benefícios da Piridostigmina terem sido definidos tanto em humanos sadios (Nóbrega, 1996 *et al.*; Pontes *et al.*, 1998; Serra *et al.*, 1998; Nóbrega *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2000; Sant'anna, 2003) quanto em pacientes com doença coronariana, (Castro *et al.*, 2002, 2004 e 2006; Nóbrega *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2009), o tratamento de cães com uma dose diária de 20 mg/kg por 14 dias levou à morte vários animais por intuscepção intestinal e, entre os animais que não morreram, foram observados efeitos adversos como hiperssalivação e tremor (Kluwe *et al.*, 1989). No mesmo estudo, quando os animais foram tratados por três meses com 2 mg/kg de Piridostigmina, foram observados efeitos intestinais como diarreia e fezes com muco.

A veiculação da Piridostigmina em lipossomas, proposta no presente trabalho, exerce especial importância na manutenção dos efeitos benéficos estabelecidos sobre o sistema cardiovascular, especialmente na prevenção de isquemias em pacientes com infarto prévio, em que a menor filtração tecidual da região infartada promove o acúmulo espontâneo de lipossomas estericamente estabilizados com PEG (Torchilin *et al.*, 1995; Lukyanov *et al.*, 2004) e na redução de seus efeitos tóxicos sobre outros órgãos. Além disso, Dunlap e Bibevsk (2003), ao avaliar a densidade de receptores muscarínicos no coração de cães saudáveis e com IC, mostraram que, nos animais do último grupo, os receptores muscarínicos encontravam-se aumentados em número no nó sinusal, como uma resposta adaptativa à redução da estimulação colinérgica. Da mesma maneira, em estudo envolvendo ratos submetidos à denervação sinoaórtica, foi mostrado um aumento na expressão dos receptores muscarínicos no átrio de tais animais, 20 dias após a denervação (Soares *et al.*, 2006). Tais estudos corroboram com a proposta de direcionamento da Piridostigmina ao tecido cardíaco isquêmico em possíveis estudos futuros envolvendo animais submetidos à ligadura de coronária. Em relação à redução da toxicidade, de fato foi observado que a encapsulação da Piridostigmina resultou em redução dos efeitos adversos causados pela dose de 1,0 mg/kg da forma livre, o que foi avaliado apenas qualitativamente por observação do experimentador.

A aparente ausência de cardiodepressão caracterizada pela morfologia normal do ECG e PA normal, observada após a administração IV da Piridostigmina nas formas livres e lipossomal, aponta para sua potencial utilização em pacientes portadores de DCV. Tal achado está em conformidade com estudo de Soares e colaboradores (2004), em que a administração oral de Piridostigmina a ratos não levou a alterações nos parâmetros hemodinâmicos basais. Substâncias parassimpaticomiméticas podem lentificar a condução do impulso elétrico cardíaco, induzindo bradicardia (Pontes *et al.*, 1990). Fármacos que aumentam a duração dos intervalos RR do ECG potencialmente aumentariam, também, outras variáveis eletrocardiográficas, como o segmento PR e o intervalo QT e, dependendo da magnitude destes aumentos, eles poderiam significar, respectivamente, lentificação patológica da condução atrioventricular (bloqueios atrioventriculares dos diferentes graus) ou aumento da duração da repolarização ventricular (Castro *et al.*, 2000). Desta forma, quando são estudados fármacos colinérgicos, é importante a avaliação de seus potenciais efeitos sobre as variáveis do ECG para assegurar que os pacientes portadores de DCV não tenham seu quadro clínico alterado.

Embora os aumentos observados para o intervalo PR e complexo QRS do ECG após administração de NA tenham sido discretos e não haja diferenças estatísticas, a Piridostigmina parece ser capaz de impedir tais alterações, já que em todos os grupos tratados com suas diferentes doses e formulações os aumentos foram ainda mais discretos ou não ocorreram. A influência da atividade colinérgica sobre esses parâmetros no modelo rato e a observação somente em uma derivação do ECG provavelmente contribuíram para a limitação da análise.

O efeito mais marcante observado pela administração IV de Piridostigmina foi sua capacidade de atenuar os efeitos da NA sobre o prolongamento do intervalo QT. O tônus autonômico exerce papel regulador sobre o intervalo QT, sendo o mesmo primariamente controlado pelo ramo parassimpático, uma vez que o bloqueio colinérgico foi relacionado ao seu prolongamento (Ahnve e Vallin, 1982). Na coronariopatia, onde a atividade vagal encontra-se reduzida, o prolongamento do intervalo QT é um fator preditor de arritmias (Zuanneti *et al.*, 1987; London *et al.*, 1998) e morte súbita (Schwartz e Wolf, 1978; Ahnve, 1991). Sendo assim, a Piridostigmina, nas doses utilizadas, apresentou potencial efeito cardioprotetor no que diz respeito à capacidade de impedir os aumentos do intervalo QT do ECG induzidos pela NA. A utilização da Piridostigmina, especialmente na forma lipossomal, poderia prevenir a ocorrência de arritmias ventriculares e morte súbita, uma vez que a encapsulação desta substância foi capaz de promover sua lenta liberação prolongando, assim, seus efeitos protetores sobre o intervalo QT até 6 horas após a administração, provavelmente por permitir a manutenção da acetilcolina na fenda sináptica por mais tempo.

Além dos efeitos benéficos sobre a função cardíaca, a Ach parece exercer efeitos protetores diretos sobre o miocárdio pela ativação dos canais $\text{mitK}^+_{\text{ATP}}$, aumentando a refratariedade cardíaca (Oldenburg *et al.*, 2002), com consequente estabilização da atividade do coração em condições de hiperatividade simpática, como anteriormente relatado. Em cães submetidos à ligadura de coronária para indução de IAM, foi demonstrado que a estimulação vagal, por aumentar a Ach no miocárdio, induziu ao aumento do fator transcricional HIF-1 α , ativando mecanismos que permitem a manutenção da viabilidade celular em condições de escassez de oxigênio (Kakinuma *et al.*, 2005). Estes efeitos foram observados num curto prazo - 3 horas - após a imposição das condições isquêmicas. A Piridostigmina em lipossomas foi capaz de manter seus efeitos no período de 2 a 6 horas após sua administração, sendo os mecanismos acima prováveis candidatos para a sua eficácia.

A administração da maior dose de NA causou significativa bradicardia reflexa, fator que interferiu na avaliação dos efeitos benéficos da Piridostigmina sobre o índice de Fridericia (QTc). De acordo com Indik e colaboradores (2006), tal cálculo pode subestimar os valores do intervalo QT quando ocorre diminuição da FC, conforme observado nos experimentos. Ademais, estudos mostraram que fármacos moduladores do SNA controlam os valores absolutos do intervalo QT independentemente da FC (Browne *et al.*, 1982) e que as condições autonômicas que afetam a função ventricular causam alterações no intervalo QT que também são independentes da FC (Magnano *et al.*, 2002).

Sobre a PA, a NA induziu aumentos que só foram contrapostos pela administração de 0,3 mg/kg de Piridostigmina na forma livre. Pode-se sugerir que a ausência de efeitos com os demais tratamentos reside no fato de que a redução da atividade colinesterásica é maior nos tecidos que no sangue circulante e que, nos animais submetidos à estimulação simpática no presente estudo, os sistemas de controle do tônus vascular encontravam-se íntegros. De maneira semelhante ao observado no presente estudo pela via intravenosa, a administração do brometo de Piridostigmina em humanos, por via oral, produziu efeitos de estimulação colinérgica, mas não atuou nas respostas hemodinâmicas reflexas induzidas por exercício físico (Nóbrega *et al.*, 1996), já que age periféricamente.

Castro e colaboradores (2000) mostraram que a redução da dispersão do índice QTc induzida pela administração oral da Piridostigmina em humanos saudáveis poderia representar, caso este resultado seja reproduzido em portadores de DCV, um mecanismo de proteção cardíaca. No presente trabalho, foi mostrado que a proteção cardíaca conferida pela administração IV de Piridostigmina em ratos envolve a modulação do intervalo QT em condições de hiperatividade simpática. Por ter sido obtida apenas uma derivação do ECG, não foi possível a avaliação da dispersão do intervalo QT. Ademais, independente da definição dos prováveis mecanismos de cardioproteção promovidos pela Piridostigmina, é sabido que o aumento do tônus vagal por ela conferido está relacionado ao bom prognóstico não só da doença cardíaca isquêmica, mas também da insuficiência cardíaca (Osterziel e Dietz, 1996), já que ambas as patologias são caracterizadas por um aumento do tônus simpático e uma diminuição da atividade cardíaca vagal.

Assim, com a demonstração do prolongamento da atividade cardioprotetora da Piridostigmina pela sua veiculação em lipossomas estabilizados estericamente, atende-se ao

objetivo principal deste trabalho. A avaliação futura de seu possível acúmulo no tecido cardíaco infartado definirá sua potencial aplicabilidade em pacientes portadores de doença cardíaca isquêmica.

13. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

A formulação de lipossomas contendo Piridostigmina obtida apresentou eficiência de encapsulação satisfatória e características físico-químicas adequadas para a sua administração *in vivo*.

A administração IV de Piridostigmina em ratos submetidos à estimulação simpática impediu as ações da noradrenalina sobre o intervalo QT, provavelmente por inibir a acetilcolinesterase, estimulando a função parassimpática e diminuindo o desequilíbrio autonômico. Esses achados foram mais evidentes quando a estimulação simpática pela administração de NA foi realizada 1 hora após o tratamento com a formulação livre na dose de 0,3 mg/kg e 2 horas após o tratamento com a formulação lipossomal na dose de 1,0 mg/kg.

A encapsulação da Piridostigmina em lipossomas permitiu o prolongamento de sua ação cardioprotetora sobre o intervalo QT até 6 horas após a administração da dose de 1,0 mg/kg, bem como reduziu os efeitos colaterais observados após a administração desta mesma dose na forma livre.

Finalmente, a veiculação da Piridostigmina em lipossomas estabilizados estericamente pode ser considerada uma potencial ferramenta terapêutica na prevenção de complicações cardiovasculares, como arritmias e morte súbita, causadas por hiperatividade simpática em pacientes com doença cardíaca isquêmica.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahnve S, Vallin H. Influence of heart rate and inhibition of autonomic tone on the QT interval. **Circulation**, v. 65, p. 435-439, 1982.

Ahnve S. Is QT interval prolongation a strong or weak predictor for cardiac death? **Circulation**, v. 84, p. 1862-65, 1991.

Alga A, Tijssen JG, Roelandt JR, et al. QTc prolongation measured by standard 12-lead electrocardiography is an independent risk factor for sudden death due to cardiac arrest. **Circulation**, v. 83, p. 1888–1894, 1991.

Antzelevitch C. Ionic, molecular, and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade de pointes. **The European Journal of Pacing, Arrhythmias and Cardiac Electrophysiology**, v. 10, p. 12-23, 2007.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellar of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238-252, 1965.

Benedict CR, Shelton B, et al. Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. **Circulation**, v. 94, p. 690-697, 1996.

Blume G, Cevc G. Liposomes for the sustained drug release *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1029, p. 91-97, 1990.

Boluyt MO, Long X, et al. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 269, p.H638-H647, 1995.

Bolis L, Govoni S, Dekke M. Handbook of the autonomic nervous system in health and disease. Edição ilustrada. Informa Health Care, 2002, 677p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Prevenção clínica de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 56p.

Browne KF, Zipes DP, et al. Influence of the autonomic nervous system on the QT interval in man. **The American Journal of Cardiology**, v. 50, p. 1099–1103, 1982.

Caride VJ, Zaret BL. Liposome accumulation in regions of experimental myocardial infarction. **Science**, v. 198, p. 735-738, 1977.

Casadei B, Conway J, et al. Effect of low doses of scopolamine on RR interval variability, baroreflex sensitivity, and exercise performance in patients with chronic heart failure. **Heart**, v. 75, p. 274-280, 1996.

Castro RRT, Serra SM, Nóbrega ACL. Reduction of Qtc interval dispersion. Potential mechanism of cardiac protection of pyridostigmine bromide. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 75, n. 3, p. 210-213, 2000.

Castro RTT, Porphirio G, *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces the QTc interval in coronary artery disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 685-689, 2002.

Castro RRT, Porphirio G, *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine protects against exercise induced myocardial ischaemia. **Heart**, v. 90, p. 1119-23, 2004.

Castro RTT, Serra SM, *et al.* Pyridostigmine reduces QTc interval during recovery from maximal exercise in ischemic heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 107, p. 138-139, 2006.

Catelli M, Feldman J, *et al.* Protective effects of centrally acting sympathomodulatory drugs on myocardial ischemia induced by sympathetic overactivity in rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n.1, p. 85-95, 2003.

Caulfield MP. Muscarinic receptors: characterization, coupling and function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 3, p. 319-79, 1993.

Caulfield MP, Birdsall NJM. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 279-290, 1998.

Cheryl CHY, Kuo BJ. Assessment of cardiac sympathetic regulation by respiratory-related arterial pressure variability in the rat, **Journal of Physiology**, v. 515, n. 3, p. 887-889, 1999.

Chonn A, Cullis PR. Recent advances in liposomal drug-delivery systems. **Current Biology**, v. 6, p. 698-708, 1995.

Communal C, Singh K, *et al.* Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the β -adrenergic pathway. **Circulation**, v. 98, p. 1329-34, 1998.

Crosasso P, Ceruti M, *et al.* Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 63, p. 19-30, 2000.

Curioni C, Cunha CB, *et al.* The decline in mortality from circulatory diseases in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 25, n. 1, p. 9-15. 2009.

Davis D, Baily R, Zelis R. Abnormalities in systemic norepinephrine kinetics in human congestive heart failure. **American Journal of Physiology**, v. 254, p. E760-E766, 1988.

De Ferrari GM, Vanoli E, *et al.* Prevention of life-threatening arrhythmias by pharmacologic stimulation of the muscarinic receptors with oxotremorine. **American Heart Journal**, v. 124, n. 4, p. 883-890, 1992.

De Ferrari GM, Salvati P, *et al.* Pharmacologic modulation of the autonomic nervous system in the prevention of sudden cardiac death. A study with propranolol, methacholine and oxotremorine in conscious dogs with a healed myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 22, n. 1, p. 283-290, 1993.

- De Melo AL, Silva-Barcellos NM, *et al.* Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, p. 227–230, 2003.
- Del Rio CL, Dawson TA, *et al.* Effects of acute vagal nerve stimulation on the early passive electrical changes induced by myocardial ischaemia in dogs: heart rate-mediated attenuation. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 8, p. 931–944, 2008.
- Devereux RB, Wachtell K, *et al.* Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. **The Journal of the American Medical Association**, v. 292, p. 2350–2356, 2004.
- Dos Santos N, Allen C, *et al.* Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1367–1377, 2007.
- Dunlap ME, Bibevski S. Mechanisms of altered vagal control in heart failure: Influence of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, p. H1632-H1640, 2003.
- Eisenhofer G, Friberg P, *et al.* Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. **Circulation**, v. 93, n. 9, p. 1667-76, 1996.
- Eliakim M, Bellet S, *et al.* Effect of vagal stimulation and acetylcholine on the ventricle. Studies in dogs with complete atrioventricular block. **Circulation Research**, v. 9, p. 1372-79, 1961.
- Francis G. Modulation of peripheral sympathetic nerve transmission. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 12, p. 250-254, 1988.
- Frézard F, Schettini DA, *et al.* Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 511-518, 2005.
- Fridericia LS. Die Systolendauer im elektrokardiogramm bei normalen menschen und bei herzkranken. **Acta Medica Scandinavica**, v. 53, p. 489, 1920.
- Folkow B, Di Bona BF, *et al.* Measurements of plasma norepinephrine concentrations in human primary hypertension. A word of caution on their applicability for assessing neurogenic contributions. **Hypertension**, v. 5, p. 399-403, 1983.
- Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 6949-53, 1988.
- Garaliené V. Ischemic preconditioning: its role in cardioprotection. **Acta Medica Lituanica**, v. 8, n. 3, p. 177-187, 2001.
- Glover DK, Ruiz M, *et al.* Cardioprotection by adenosine A2A agonists in a canine model of myocardial stunning produced by multiple episodes of transient ischemia. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, p. H3164-H3171, 2007.

Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 1, n. 2, p. 169-177, 1995.

Goldstein RE, Beiser GD, *et al.* Impairment of autonomically mediated heart rate control in patients with cardiac dysfunction. **Circulation Research**, v. 36, p. 571-578, 1975.

Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da terapêutica. 11ed. Rio de Janeiro. McGraw Hill, 2006, 1436p.

Grabe-Guimarães A, Alves LM, *et al.* Pyridostigmine blunts the increases in myocardial oxygen demand elicited by the stimulation of the central nervous system in anesthetized rats. **Clinical Autonomic Research**, v. 9, p. 83-89, 1999.

Grabe-Guimarães A. Alterações cardiovasculares induzidas pela ativação neuronal do sistema nervoso central pelo glutamato em ratos: aplicações na investigação de drogas cardioprotetoras. Tese de doutorado, 275 p., FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

Graham LN, Smith PA, *et al.* Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 106, p. 793-797, 2002.

Gregoriadis G. Liposome preparation and related techniques. In Liposome Technology, v. 1, ed. 2. Edited by Gregoriadis G. Boca Raton: CRC Press, 1993, 1240p.

Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.527-537,1995.

Harasym TO, Tardi P, *et al.* Poly(ethylene glycol)-modified phospholipids prevent aggregation during covalent conjugation of proteins to liposomes. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 187-194, 1995.

Hasking GJ, Esler MD, *et al.* Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. **Circulation**, v. 73, p. 615-621, 1986.

Hayano T, Shimizu A, *et al.* Paradoxical effects of pirenzepine on parasympathetic activity in chronic heart failure and control. **International Journal of Cardiology**, v. 68, p. 47-56, 1999.

Hegazy N, Demirel M, Yazan Y. Preparation and in vitro evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 171-174, 2002.

Henning RJ, Khalil IR, Levy MN. Vagal stimulation attenuates sympathetic enhancement of left ventricular function. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 27, p. H1470-H1475, 1990.

Hjalmarson A. Effects of beta blockade on sudden cardiac death during acute myocardial infarction and the postinfarction period. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, p. 35J-39J, 1997.

Hope MJ, Bally MB, *et al.* Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 40, p. 89-95, 1986.

Hoyer D, Maestrib R, *et al.* Autonomic response to cardiac dysfunction in chronic heart failure: a risk predictor based on autonomic information flow. **Pacing and Clinical Electrophysiology**, v. 31, p. 214-220, 2008.

Hunter DG, Frisken BJ. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 2996–3002, 1998.

Indik JH, Pearson EC, Fried K, Woosley RL. Bazett and Fridericia QT correction formulas interfere with measurement of drug-induced changes in QT interval. **Heart Rhythm** 3(9), 1003-1007, 2006.

Ishise H, Asanoi H, *et al.* Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1234–41, 1998.

ISIS I (First International Study on Infarct Survival) Collaborative Group. Randomized trial of intravenous atenolol among 16027 cases of suspect acute myocardial infarction. **The Lancet**, vol. 2, p. 57-66, 1986.

Izraeli S, Alcalay M, *et al.* Modulation of the dose-dependent effects of atropine by low-dose pyridotigmine: quantification by spectral analysis of heart rate fluctuations in healthy human beings. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 39, p. 613-617, 1991.

Jovanovic S, Jovanovic A. Models of cardioprotection. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 4, p. 185-190, 2007.

Kakinuma Y, Ando M, *et al.* Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive non-hypoxic induction of HIF-1 α . **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 579, p. 2111–18, 2005.

Kakinuma Y, Akiyama T, *et al.* Cardiomyocytes produces acetylcholine in response to muscarinic receptor stimulation: a possible mechanism for amplification of cardioprotective effects of cardiac vagal nerve. **Circulation**, v. 118, p. 538-545, 2008.

Katare RG, Ando M, *et al.* Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 137, n. 1, p. 223-231, 2009.

Kawada T, Yamazaki T, *et al.* Vagal stimulation suppresses ischemia-induced myocardial interstitial norepinephrine release. **Life Sciences**, v. 78, p. 882-887, 2006.

Kent KM, Smith ER, *et al.* Electrical stability of acutely ischemic myocardium. Influence of heart rate and vagal stimulation. **Circulation**, v. 47, p. 291-298, 1973.

Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. **Biochemical Journal**, v. 186, p. 591-598, 1980.

- Klibanov AL, Maruyamal K, *et al.* Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 268, n. 1, 1990.
- Kluwe WM, Page JG, *et al.* Pharmacological and toxicological evaluation of orally administered pyridostigmine in dogs. **Toxicological Sciences**, v. 14, n. 1, p. 40-53, 1989.
- Kolka MA, Stephenson L A. Human temperature regulation during exercise after oral pyridostigmine administration. **Aviation, Space, and Environmental Medicine**, v. 61, p. 220-224, 1990.
- Krejci A, Tucek S. Quantitation of mRNAs for M1 to M5 subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 1267–1272, 2002.
- Kubler W, Haas M. Cardioprotection: definition, classification and fundamental principles. **Heart**, v. 75, p. 330–333, 1996.
- Kurachi Y. G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channels. **American Journal of Physiology**, v. 269, p. C821–C830, 1995.
- Lahiri MK, Kannankeril PJ, Goldberger JJ. Assessment of autonomic function in cardiovascular disease. Physiological basis and prognostic implications. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, p. 1725–33, 2008.
- Lasic DD. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.
- La Rovere MT, Mortara A, *et al.* Scopolamine improves autonomic balance in advanced congestive heart failure. **Circulation**, v. 90, p. 838-843, 1994.
- Li M, Zheng C, *et al.* Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. **Circulation**, v. 109, p. 120-124, 2004.
- Lo'effelholz K, Pappano AJ. The parasympathetic neuroeffector junction of the heart. **Pharmacological Reviews**, v. 37, p. 1-24, 1985.
- London B, Jerona A, *et al.* Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N terminus and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel. **Biophysics**, v. 95, p. 2926–31, 1998.
- Lukyanov AN, Hartner WC, Torchilin VP. Increased accumulation of PEG–PE micelles in the area of experimental myocardial infarction in rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 187– 193, 2004.
- Mackay J, Mensah G. The Atlas of Heart Disease and Stroke. World Health Organization Nonserial Publication, 2004 Disponível em:
http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/index.html Acessado em: 03/03/2009.
- Magnano AR, Holleran S, *et al.* Autonomic nervous system influences on qt interval in normal subjects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, p. 1820-26, 2002.

- Mancia G. Cardiac and Vascular Protection. **The Medscape Journal of Medicine**, v. 10(Sup), p. S7-S23, 2008.
- Manfrini O, Morgagni M, *et al.* Changes in autonomic nervous system activity: spontaneous versus balloon-induced myocardial ischaemia. **European Heart Journal**, v. 25, p. 1502–08, 2004.
- Mann DL, Kent RL, *et al.* Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. **Circulation**, v. 85, n. 2, p. 790-804, 1992.
- Martins JB, Zipes DP. Effects of sympathetic and vagal nerves on recovery properties of the endocardium and epicardium of the canine left ventricle. **Circulation Research**, v. 46, p. 100-110, 1980.
- Monnard PA, Oberholzer T, Luisi PL. Entrapment of nucleic acids in liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1329, n. 1, p. 39-50, 1997.
- Mori A, Klivanov AL, *et al.* Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM₁ on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 284, n. 2, p. 263-266, 1991.
- Myers RW, Pearlman AS, *et al.* Beneficial effects of vagal stimulation and bradycardia during experimental acute myocardial ischemia. **Circulation**, v. 49, p. 943-947, 1974.
- Murakawa Y, Yamashita T, *et al.* Is the QT Interval an Indicator of Autonomic State? **Japanese Heart Journal**, v. 41, p. 713-721, 2000.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, p. 1124–36, 1986.
- Nayar R, Hope MJ, Cullis PR. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. **Biochimica et Biophysics Acta**, v. 986, p. 200-206, 1989.
- Nóbrega ACL, Carvalho ACG, Bastos BG. Resting and reflex heart rate response during cholinergic stimulation with pyridostigmine in humans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1461-65, 1996.
- Nóbrega ACL, Carvalho ACG, *et al.* Pyridostigmine blunts the cardiac response to mental stress. **Clinical Autonomic Research**, v. 9, p. 1-6, 1999.
- Nóbrega ACL, Castro RRT. Parasympathetic dysfunction as risk factor in myocardial infarction: what is the treatment? **American Heart Journal**, v. 140, p. E-23, 2000.
- Nóbrega ACL, Loures DL, *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine prevents the impairment in ventricular function during mental stress in coronary artery disease patients. **International Journal of Cardiology**, v.125, p. 418–421, 2008.

- Oldenburg O, Qin Q, *et al.* A cetylcholine leads to free radical production dependent on KATP channels, G proteins, phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine i kinase. **Cardiovascular Research**, v. 55, p. 544–552, 2002.
- Osterziel KJ, Dietz R. Improvement of vagal tone by ACE inhibition: a mechanism of cardioprotection in patients with mild-to-moderate heart failure. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 27, sup. 2, p. S25-S30, 1996.
- Packer M, Bristow MR, *et al.* The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 1349-55, 1986.
- Padley JR, Overstreet DH, *et al.* Impaired cardiac and sympathetic autonomic control in rats differing in acetylcholine receptor sensitivity. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, p. 1985-1992, 2005.
- Palmer NT, Caride VJ, *et al.* The mecanism of liposome accumulation in infarction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 797, p. 363-368, 1984.
- Papahadjopoulos D, Allen TM, *et al.* Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 11460-64, 1991.
- Patel HM. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 9, p. 39-90, 1992.
- Pavlović M, Beta blockers in cardioprotection after acute myocardial infarction. **The Scientific Journal Facta Universitatis**. v.7, n. 1, p. 11-14, 2000.
- Pedretti R, Fesca EC, *et al.* Effects of Oral Pirenzepine on Heart Rate Variability and Baroreceptor Reflex Sensitivity After Acute Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 24, n. 4, p. 915-921, 1995.
- Pedretti R, Prete G, *et al.* Autonomic modulation during acute myocardial ischemia by low-dose pirenzepine in conscious dogs with a healed myocardial infarction: a comparison with [beta]-adrenergic blockade. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 41, p. 671-677, 2003.
- Piegas LS, Timerman A, *et al.* III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, sup. IV, 87p., 2004.
- Pomeranz B, Macaulay RJ, *et al.* Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. **American Journal of Physiology**, v. 248, p. H151–H53, 1985.
- Pontes PV, Bastos BG, *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects, hemodynamic and echocardiographic analysis. **Journal of Cardiac Failure**, v. 4, n. 3, Sup. 1, 1998.
- Porter TM, Eckberg DL, *et al.* Autonomic pathophysiology in heart failure patients: sympathetic-cholinergic interrelations. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 1362-1371, 1990.

- Rautaharju PM, Surawicz B, Gettes LS. Recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram. Part IV: The ST Segment, T and U Waves, and the QT Interval. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n.11, p. 982-991, 2009.
- Reis AF, Bastos BG, *et al.* Disfunção parassimpática, variabilidade da frequência cardíaca e estimulação colinérgica após infarto agudo do miocárdico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, n. 3, 1998.
- Rosenwinkel ET, Bloomfield DM, *et al.* Exercise and autonomic function in health and cardiovascular disease. **Cardiology Clinics**, v. 19, n.3, p.369-87, 2001.
- Sant'anna ID, Souza EB, *et al.* Cardiac function during mental stress: cholinergic modulation with pyridostigmine in healthy subjects. **Clinical Science**, v. 105, p. 161-165, 2003.
- Schaffazick SR, Guterres SS. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- Schlaich MP, Kaye DM, *et al.* Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. **Circulation**, v. 108, p. 560-565, 2003.
- Schmechel A, Grimm M, *et al.* Treatment with atorvastatin partially protects the rat heart from harmful catecholamine effects. **Cardiovascular Research**, v. 82, p. 100-106, 2009.
- Schwartz PJ, Verrier PL, Lown B. Effect of selectomy and vagotomy on ventricular refractoriness, **Circulation Research**, v. 40, p. 536-540, 1977.
- Schwartz PJ, Wolf S. QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. **Circulation**, v. 57, p. 1074-77, 1978.
- Schouten EG, Dekker, JM, *et al.* QT interval prolongation predicts cardiovascular mortality in a apparently healthy population. **Circulation**, v. 84, p. 1516-23, 1991.
- Serra SM, Vivacqua R, *et al.* Cardiopulmonary exercise test during cholinergic stimulation with pyridostigmine in health subjects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, sup C, p. 407C, 1998.
- Serra SM, Costa RV, *et al.* Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 15, n. 2, p. 124-129, 2009.
- Stephenson LA, Kolka MA. Acetylcholinesterase inhibitor, pyridostigmine bromide, reduces skin blood flow in humans. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. R951-R957, 1990.
- Soares PPS, Nóbrega ACL, Ushizima MR, Irigoyen MCC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 113, p. 24-31, 2004.
- Soares PPS, Porto CS, Abdalla FMF, Fuente RN, Moreira ED, Krieger EM, Irigoyen MCC. Effects of rat sinoaortic denervation on the vagal responsiveness and expression of muscarinic

acetylcholine receptors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 331-336, 2006.

Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 1, p. 10-14, 1980.

Sharma VK, Colecraft HM, *et al.* Molecular and functional identification of m1 muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes. **Circulation Research**, v. 79, p. 86-93, 1996.

Shi H, Wang H, Wang Z. Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. **Molecular Pharmacology**, v. 55, p. 497-507, 1999.

Tai CT, Chiou CW, Chen SA. Interaction between the autonomic nervous system and atrial tachyarrhythmias. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 13, p. 83-7, 2002.

Taggart P, Sutton P, *et al.* Effect of adrenergic stimulation on action potential duration restitution in humans. **Circulation**, v. 107, p. 285-289, 2003.

Takahama H, Minamino T, *et al.* Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 8, p. 709-717, 2009.

Torchilin VP, Klivanov AL, *et al.* Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 6, p. 2716-19, 1992.

Torchilin VP. Targeting of drugs and drug carriers within the cardiovascular system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, p. 75-101, 1995.

Torchilin VP, Narula J, *et al.* Poly(ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes: factors influencing targeted accumulation in the infarcted myocardium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1279, p. 75-83, 1996.

Vanoli E, De Ferrari GM, *et al.* Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 68, p. 1471-81, 1991.

Vaseghi M, Shivkumar K. The Role of the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 50, n. 6, p. 404-419, 2008.

Venkatesh G, Fallen EL, *et al.* Double blind placebo controlled trial of short term transdermal scopolamine on heart rate variability in patients with chronic heart failure. **Heart**, v. 76, p. 137-143, 1996.

Verma DD, Hartner WC, *et al.* ATP-Loaded Liposomes Effectively Protect the Myocardium in Rabbits with an Acute Experimental Myocardial Infarction. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 12, 2005.

Wagner GS, Macfarlane P, *et al.* Recommendations for the standardization and interpretation of the Electrocardiogram. Part VI: Acute ischemia/infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 11, p. 1003-11, 2009.

Wang H, Han H, *et al.* Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 1029–36, 2001.

Wang H, Lu Y, Wang Z. Function of cardiac M3 receptors. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2007.

Waxman MB, Cupps CL, Cameron DA. Modulation of an cardioventricular rhythm by vagal tone. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 11, p. 1052-60, 1988.

Woodle MC. Sterically stabilized liposome therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 249-256, 1995.

Woodle MC. Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 32, p.139-152, 1998.

Yao Z, Gross GJ. Role of nitric oxide, muscarinic receptors, and the ATP-sensitive K⁺ channel in mediating the effects of acetylcholine to mimic preconditioning in dogs. **Circulation Research**, v. 73, p. 1193-1201, 1993.

Zamotrinsky AV, Kondratiev B, De Jong JW. Vagal neurostimulation in patients with coronary artery disease. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 88, p. 109–116, 2001.

Zipes DP, Wellens HJJ. Sudden cardiac death. **Circulation**, v.98, p. 2334–51, 1998.

Zuanetti G, De Ferrari GM, *et al.* Protective effect of vagal stimulation on reperfusion arrhythmias in cats. **Circulation Research**, v. 61, p. 429-435, 1987.

15. ANEXO

Tabela 15: Variações percentuais do intervalo QT do ECG após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	Controle	QT NA 1µg 1 hora						QT NA 1µg 2 horas					
		Livre			Lipo			Livre			Lipo		
		0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?
Média	8,06	2,57	0,54	3,42	ns	2,05	1,51	1,00	1,31	ns	0,38	1,87	ns
5 seg	16,43	5,73	3,31	8,30	***	5,87	6,47	6,47	3,79	*	1,97	5,44	***
15 seg	19,86	9,11	6,50	13,31	***	8,96	10,66	*	6,90	ns	5,06	8,41	***
20 seg	20,12	9,70	6,27	16,23	***	12,44	12,75	ns	11,69	ns	4,54	8,50	***
25 seg	16,38	9,36	5,57	17,93	***	14,80	12,30	ns	14,31	ns	6,89	8,14	ns
30 seg	12,87	8,64	5,57	15,43	*	15,31	10,61	ns	11,93	ns	7,84	8,02	ns
45 seg	8,47	8,21	4,40	12,32	ns	10,62	8,53	ns	11,91	ns	6,60	8,14	ns
1 min	5,30	7,03	4,40	10,62	ns	7,71	7,04	ns	10,23	ns	5,32	6,42	ns
1,5 min	4,01	5,91	3,71	8,50	ns	5,48	4,48	ns	8,49	ns	4,74	5,88	ns
2 min	3,37	4,43	1,19	5,91	ns	2,81	2,81	ns	3,74	ns	5,13	3,42	ns
2,5 min	2,13	2,51	0,18	3,92	ns	2,30	1,56	ns	2,82	ns	2,64	1,87	ns
3 min	1,18	1,58	0,41	2,80	ns	1,23	0,53	ns	1,82	ns	3,46	1,35	ns
4 min	1,88	0,81	0,19	1,97	ns	0,73	0,47	ns	1,65	ns	2,32	0,53	ns
5 min	2,66	0,38	0,61	1,94	ns	0,69	0,48	ns	1,71	ns	1,75	0,51	ns

QT NA 1µg 4 horas					
0.10	p<0.05?	Lipo		1.00	p<0.05?
		0.30	p<0.05?		
3,63	ns	1,02	ns	2,60	ns
9,55	ns	4,54	***	6,22	*
16,52	ns	7,40	***	6,98	***
19,08	ns	9,62	***	7,84	***
17,77	ns	9,92	ns	7,89	*
15,37	ns	9,19	ns	7,24	ns
13,26	ns	7,08	ns	6,39	ns
11,51	ns	5,45	ns	5,57	ns
9,17	ns	3,58	ns	4,92	ns
5,87	ns	1,72	ns	2,72	ns
3,33	ns	0,92	ns	0,98	ns
2,75	ns	0,24	ns	0,96	ns
1,69	ns	-0,20	ns	0,80	ns
1,70	ns	-0,35	ns	0,98	ns

QT NA 1µg 6 horas					
0.10	p<0.05?	Lipo		1.00	p<0.05?
		0.30	p<0.05?		
2,51	ns	1,56	ns	1,41	ns
8,08	*	7,09	**	5,56	***
13,06	ns	12,50	ns	10,51	**
16,09	ns	14,48	ns	12,92	*
17,93	ns	16,27	ns	12,08	ns
16,47	ns	15,29	ns	10,86	ns
12,68	ns	11,22	ns	8,49	ns
8,92	ns	8,10	ns	6,87	ns
5,99	ns	5,08	ns	5,64	ns
3,34	ns	2,58	ns	4,10	ns
1,58	ns	0,89	ns	2,95	ns
1,53	ns	0,77	ns	1,42	ns
1,15	ns	0,53	ns	0,98	ns
1,11	ns	0,31	ns	0,51	ns

Tabela 16: Variações percentuais do intervalo PR do ECG após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piritostigmina livre e lipossomal.

Tempo	PR NA 1µg										
	1 hora					2 horas					
	Livre		Lipo			Livre		Lipo			
	Média	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05	0.10	p<0.05	0.30	p<0.05	1.00	p<0.05?
5 seg	0,22	-0,89	ns	0,33	ns	0,31	ns	0,16	ns	0,40	ns
10 seg	-0,09	-0,22	ns	0,16	ns	0,83	ns	-0,15	ns	0,40	ns
15 seg	0,95	-0,54	ns	0,22	ns	0,68	ns	0,06	ns	0,04	ns
20 seg	1,01	0,24	ns	0,13	ns	0,70	ns	-0,82	ns	-0,55	ns
25 seg	1,37	0,05	ns	-0,70	ns	0,70	ns	-1,31	ns	-0,19	ns
30 seg	2,12	0,41	ns	0,02	ns	1,05	ns	0,51	ns	-0,79	ns
45 seg	2,67	0,95	ns	-0,26	ns	1,05	ns	0,48	ns	-0,27	ns
1 min	2,00	1,68	ns	-0,46	ns	1,25	ns	0,61	ns	-0,68	ns
1,5	1,91	0,95	ns	-0,78	ns	1,58	ns	0,73	ns	-0,52	ns
2 min	1,83	1,21	ns	-0,10	ns	1,96	ns	1,06	ns	0,64	ns
2,5	1,24	0,67	ns	-0,44	ns	1,47	ns	0,95	ns	0,33	ns
3min	0,47	-0,13	ns	-0,70	ns	0,53	ns	0,40	ns	-0,01	ns
4 min	-0,10	-0,35	ns	-0,27	ns	-0,20	ns	-0,87	ns	-0,18	ns
5 min	-0,51	-0,84	ns	0,18	ns	-0,01	ns	0,30	ns	0,15	ns

PR NA 1µg										
4 horas					6 horas					
Livre		Lipo			Livre		Lipo			
	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?
0.10	0.63	ns	-0.16	ns	0.55	ns	0.36	ns	0.35	ns
0.30	1.35	ns	-0.41	ns	0.48	ns	0.91	ns	1.01	ns
1.00	0.91	ns	-0.41	ns	-0.50	ns	0.28	ns	0.51	ns
0.10	0.53	ns	0.01	ns	-0.09	ns	0.51	ns	0.54	ns
0.30	1.19	ns	0.12	ns	-0.07	ns	0.41	ns	0.36	ns
1.00	-0.08	ns	0.01	ns	-0.76	ns	-0.57	ns	-0.47	ns
0.10	1.08	ns	0.09	ns	-0.51	ns	0.20	ns	0.24	ns
0.30	1.49	ns	-0.02	ns	-0.53	ns	0.51	ns	0.49	ns
1.00	1.92	ns	0.46	ns	0.11	ns	0.79	ns	0.79	ns
0.10	1.57	ns	1.32	ns	0.83	ns	0.95	ns	1.08	ns
0.30	1.26	ns	0.68	ns	0.50	ns	0.68	ns	0.53	ns
1.00	0.25	ns	0.20	ns	-0.13	ns	-0.01	ns	-0.06	ns
0.10	-0.16	ns	0.12	ns	0.08	ns	-0.05	ns	0.02	ns
0.30	0.14	ns	-0.32	ns	-0.18	ns	0.05	ns	0.13	ns

PR NA 1µg										
1 hora					2 horas					
Livre		Lipo			Livre		Lipo			
	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?
0.10	-0.54	ns	0.07	ns	0.42	ns	0.42	ns	0.74	ns
0.30	0.44	ns	0.22	ns	0.28	ns	0.28	ns	0.00	ns
1.00	1.16	ns	0.20	ns	0.16	ns	0.16	ns	-1.22	ns
0.10	1.22	ns	-0.78	ns	-0.63	ns	-0.63	ns	-2.07	ns
0.30	0.19	ns	-0.44	ns	-0.38	ns	-0.38	ns	-2.22	ns
1.00	0.16	ns	-0.45	ns	-0.56	ns	-0.56	ns	-1.78	ns
0.10	0.82	ns	-0.08	ns	0.32	ns	0.32	ns	-0.37	ns
0.30	0.71	ns	0.17	ns	0.31	ns	0.31	ns	0.19	ns
1.00	1.76	ns	0.48	ns	0.46	ns	0.46	ns	0.32	ns
0.10	1.89	ns	0.25	ns	0.61	ns	0.61	ns	0.28	ns
0.30	1.42	ns	0.02	ns	0.79	ns	0.79	ns	0.54	ns
1.00	-0.33	ns	-0.37	ns	0.71	ns	0.71	ns	-0.98	ns
0.10	-1.06	ns	-0.33	ns	-0.02	ns	-0.02	ns	-1.22	ns
0.30	-1.05	ns	0.10	ns	-0.51	ns	-0.51	ns	-2.02	ns

Tabela 17: Variações percentuais do complexo QRS do ECG após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	Control	QRS NA 1µg												
		1 hora			2 horas									
		Livre	Lipo	p<0.05?	Livre	Lipo	p<0.05?							
5 seg	-1,24	0,10	0,08	0,10	0,10	0,27	0,30	0,23	ns	1,00	0,66	ns		
10 seg	-1,39	-0,43	0,08	0,20	ns	ns	0,15	ns	ns	ns	-0,09	ns	0,23	ns
15 seg	-1,10	-1,01	0,20	0,96	ns	ns	-0,67	ns	ns	ns	0,66	ns	0,11	ns
20 seg	0,22	-0,09	2,00	2,00	ns	ns	0,57	ns	ns	ns	0,36	ns	0,05	ns
25 seg	1,13	-0,17	1,43	1,61	ns	ns	1,78	ns	ns	ns	1,42	ns	0,08	ns
30 seg	0,71	0,67	1,61	1,38	ns	ns	0,77	ns	ns	ns	0,30	ns	-0,28	ns
45 seg	1,03	-0,15	0,36	-2,15	ns	ns	0,70	ns	ns	ns	0,52	ns	-0,03	ns
1 min	1,29	-0,75	0,14	-0,94	ns	ns	0,60	ns	ns	ns	1,72	ns	0,70	ns
1,5	0,93	0,64	0,16	-0,75	ns	ns	0,09	ns	ns	ns	1,73	ns	0,19	ns
2 min	-0,21	-0,62	-0,61	0,00	ns	ns	0,29	ns	ns	ns	1,51	ns	0,15	ns
2,5	-0,28	-0,24	-0,22	-0,45	ns	ns	-0,58	ns	ns	ns	-0,35	ns	-0,75	ns
3 min	-0,53	-0,64	-1,07	-0,89	ns	ns	-0,29	ns	ns	ns	0,14	ns	-0,09	ns
4 min	-0,27	-0,59	0,00	-0,95	ns	ns	-0,29	ns	ns	ns	-0,42	ns	-1,04	ns
5 min	0,11	-0,36	-0,53	-1,11	ns	ns	-0,50	ns	ns	ns	-0,63	ns	0,48	ns
				-1,96	ns	ns	-0,66	ns	ns	ns	-0,79	ns	-1,02	ns
				0,71	ns	ns								

Tempo	Control	QRS NA 1µg												
		4 horas			6 horas									
		Livre	Lipo	p<0.05?	Livre	Lipo	p<0.05?							
5 seg	-1,24	0,10	0,08	0,10	0,10	0,27	0,30	0,23	ns	1,00	0,66	ns		
10 seg	-1,39	-0,43	0,20	0,96	ns	ns	-0,67	ns	ns	ns	0,66	ns	0,11	ns
15 seg	-1,10	-1,01	2,00	2,00	ns	ns	0,57	ns	ns	ns	0,36	ns	0,05	ns
20 seg	0,22	-0,09	1,43	1,61	ns	ns	1,78	ns	ns	ns	1,42	ns	0,08	ns
25 seg	1,13	-0,17	1,43	1,38	ns	ns	0,77	ns	ns	ns	0,30	ns	-0,28	ns
30 seg	0,71	0,67	1,61	-2,15	ns	ns	0,70	ns	ns	ns	0,52	ns	-0,03	ns
45 seg	1,03	-0,15	0,36	-0,94	ns	ns	0,60	ns	ns	ns	1,72	ns	0,70	ns
1 min	1,29	-0,75	0,14	-0,75	ns	ns	0,09	ns	ns	ns	1,73	ns	0,19	ns
1,5	0,93	0,64	0,16	0,00	ns	ns	0,29	ns	ns	ns	1,51	ns	0,15	ns
2 min	-0,21	-0,62	-0,61	-0,45	ns	ns	-0,58	ns	ns	ns	-0,35	ns	-0,75	ns
2,5	-0,28	-0,24	-0,22	-0,89	ns	ns	-0,32	ns	ns	ns	0,14	ns	-0,09	ns
3 min	-0,53	-0,64	-1,07	-0,95	ns	ns	-0,29	ns	ns	ns	-0,42	ns	-1,04	ns
4 min	-0,27	-0,59	0,00	-0,95	ns	ns	-0,50	ns	ns	ns	-0,63	ns	0,48	ns
5 min	0,11	-0,36	-0,53	-1,11	ns	ns	-0,66	ns	ns	ns	-0,79	ns	-1,02	ns
				-1,96	ns	ns								
				0,71	ns	ns								

Tabela 18: Variações percentuais da pressão arterial sistólica após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	Controle	PAS NA 1µg												
		1 hora			2 horas									
		Livre	Lipo	p<0,05?	Livre	Lipo	p<0,05?							
5 seg	27,54	19,19	0,10	9,81	20,93	0,30	24,06	1,00	24,06	ns	1,00	24,06	ns	p<0,05?
10 seg	56,11	36,20	ns	16,26	30,66	ns	34,02	ns	34,02	ns	ns	34,02	ns	ns
15 seg	55,14	34,76	ns	35,83	34,25	ns	39,22	ns	39,22	ns	ns	39,22	ns	ns
20 seg	49,95	29,91	ns	22,32	38,39	*	39,81	ns	39,81	ns	ns	39,81	ns	ns
25 seg	48,72	27,07	ns	19,92	31,02	ns	37,34	ns	37,34	ns	ns	37,34	ns	ns
30 seg	46,97	24,99	ns	19,64	28,24	ns	36,29	ns	36,29	ns	ns	36,29	ns	ns
45 seg	41,80	19,82	ns	20,14	27,98	ns	32,97	ns	32,97	ns	ns	32,97	ns	ns
1 min	34,24	15,32	ns	18,90	24,85	ns	27,37	ns	27,37	ns	ns	27,37	ns	ns
1,5 min	21,95	10,93	ns	13,00	17,93	ns	15,70	ns	15,70	ns	ns	15,70	ns	ns
2 min	16,41	10,59	ns	9,02	13,51	ns	13,84	ns	13,84	ns	ns	13,84	ns	ns
2,5 min	10,57	8,10	ns	3,76	9,46	ns	10,30	ns	10,30	ns	ns	10,30	ns	ns
3 min	4,57	7,99	ns	0,77	7,79	ns	6,45	ns	6,45	ns	ns	6,45	ns	ns
4 min	-1,93	3,94	ns	-0,78	2,59	ns	0,02	ns	0,02	ns	ns	0,02	ns	ns
5 min	-1,87	1,78	ns	-1,52	3,22	ns	-1,42	ns	-1,42	ns	ns	-1,42	ns	ns

PAS NA 1µg						
4 horas						
Lipo						
0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	1,00
12,67	ns	14,68	ns	33,60	ns	33,60
26,57	ns	24,31	*	45,68	ns	45,68
33,15	ns	27,91	ns	52,52	ns	52,52
28,78	ns	34,48	ns	54,08	ns	54,08
26,63	ns	27,34	ns	50,53	ns	50,53
26,06	ns	25,02	ns	49,88	ns	49,88
24,63	ns	21,90	ns	42,66	ns	42,66
21,71	ns	17,37	ns	35,29	ns	35,29
16,33	ns	13,76	ns	22,74	ns	22,74
8,99	ns	11,71	ns	17,88	ns	17,88
4,52	ns	9,28	ns	14,21	ns	14,21
3,93	ns	6,95	ns	10,02	ns	10,02
1,25	ns	3,19	ns	3,25	ns	3,25
3,21	ns	0,58	ns	1,68	ns	1,68

PAS NA 1µg						
6 horas						
Lipo						
0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	1,00
37,46	ns	25,28	ns	7,85	ns	7,85
51,16	ns	36,42	ns	35,75	ns	35,75
55,50	ns	47,32	ns	43,53	ns	43,53
56,74	ns	56,35	ns	38,34	ns	38,34
52,02	ns	48,15	ns	35,92	ns	35,92
51,01	ns	45,44	ns	34,68	ns	34,68
41,72	ns	40,28	ns	31,90	ns	31,90
34,65	ns	34,34	ns	29,10	ns	29,10
22,02	ns	23,64	ns	20,85	ns	20,85
18,10	ns	15,90	ns	13,81	ns	13,81
12,42	ns	10,97	ns	9,20	ns	9,20
12,12	ns	9,02	ns	4,85	ns	4,85
5,65	ns	4,70	ns	-0,09	ns	-0,09
2,01	ns	1,85	ns	0,83	ns	0,83

Tabela 19: Variações percentuais da pressão arterial diastólica após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	PAD NA 1µg													
	Controle	1 hora					2 horas							
		Livre		Lipo			Livre		Lipo					
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	1,00	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?
5 seg	36,13	21,72	ns	14,95	ns	26,77	ns	27,12	ns	9,56	11,47	ns	18,96	ns
10 seg	56,80	47,38	ns	47,47	ns	41,05	ns	42,61	ns	25,74	35,18	ns	40,00	ns
15 seg	51,94	42,97	ns	42,26	ns	44,80	ns	47,31	ns	43,98	42,41	ns	49,74	ns
20 seg	49,55	34,51	ns	32,72	ns	48,02	ns	46,88	ns	58,36	35,50	ns	55,48	ns
25 seg	47,33	29,93	ns	28,69	ns	40,42	ns	46,62	ns	53,08	32,85	ns	47,58	ns
30 seg	45,02	26,64	ns	26,55	ns	37,06	ns	42,36	ns	45,18	31,55	ns	47,83	ns
45 seg	38,07	19,35	ns	21,25	ns	34,53	ns	37,14	ns	33,64	27,82	ns	44,47	ns
1 min	30,84	14,95	ns	16,49	ns	30,40	ns	31,54	ns	25,81	25,63	ns	40,76	ns
1,5 min	16,73	11,56	ns	14,25	ns	22,89	ns	20,11	ns	18,88	20,61	ns	33,40	ns
2 min	13,84	8,58	ns	8,58	ns	15,29	ns	15,49	ns	12,77	14,56	ns	27,44	ns
2,5 min	8,61	10,75	ns	6,35	ns	8,09	ns	9,12	ns	6,37	7,25	ns	19,63	ns
3 min	1,92	7,41	ns	5,24	ns	10,38	ns	6,11	ns	3,49	4,66	ns	11,67	ns
4 min	-0,49	4,88	ns	3,58	ns	2,85	ns	0,99	ns	-2,06	0,94	ns	4,05	ns
5 min	-1,98	2,97	ns	1,55	ns	1,32	ns	-1,14	ns	-2,44	-0,94	ns	-0,09	ns

PAD NA 1µg														
6 horas														
Tempo	Controle	Livre					Lipo							
		0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	
5 seg	16,69	17,94	ns	17,94	ns	35,23	ns	35,23	ns	33,20	30,26	ns	5,50	ns
10 seg	33,74	29,53	ns	29,53	ns	57,30	ns	57,30	ns	61,72	45,73	ns	43,25	ns
15 seg	40,48	33,85	ns	33,85	ns	63,94	ns	63,94	ns	66,73	57,52	ns	54,91	ns
20 seg	35,05	39,34	ns	39,34	ns	64,40	ns	64,40	ns	65,29	65,88	ns	47,84	ns
25 seg	31,70	32,42	ns	32,42	ns	61,83	ns	61,83	ns	59,24	55,83	ns	43,55	ns
30 seg	31,47	30,72	ns	30,72	ns	58,22	ns	58,22	ns	56,72	53,18	ns	42,91	ns
45 seg	28,40	22,98	ns	22,98	ns	47,64	ns	47,64	ns	44,64	44,98	ns	38,60	ns
1 min	24,66	17,17	ns	17,17	ns	41,01	ns	41,01	ns	38,72	38,24	ns	33,78	ns
1,5 min	17,72	13,95	ns	13,95	ns	24,80	ns	24,80	ns	24,08	25,59	ns	22,36	ns
2 min	8,45	12,85	ns	12,85	ns	17,29	ns	17,29	ns	17,77	16,78	ns	13,43	ns
2,5 min	3,49	10,83	ns	10,83	ns	11,29	ns	11,29	ns	11,46	10,32	ns	7,22	ns
3 min	2,08	7,06	ns	7,06	ns	8,17	ns	8,17	ns	7,24	6,19	ns	3,07	ns
4 min	0,02	3,03	ns	3,03	ns	2,35	ns	2,35	ns	3,47	2,50	ns	0,58	ns
5 min	2,19	1,18	ns	1,18	ns	0,68	ns	0,68	ns	1,25	-0,17	ns	2,96	ns

Tabela 20: Variações percentuais da frequência cardíaca após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	FC NA 1µg												
	Controle	1 hora					2 horas						
			Livre		Lipo			Livre		Lipo			
		p<0,05?	0.10	0.30	p<0,05?	0.10	0.30	p<0,05?	0.10	0.30	p<0,05?	1.00	p<0,05?
5 seg	0,45	ns	-0,74	-0,98	ns	-0,76	-0,80	ns	-0,07	0,49	ns	-1,70	ns
10 seg	0,17	ns	-1,63	-1,52	ns	-1,87	-1,38	ns	0,28	-1,44	ns	-1,61	ns
15 seg	-1,14	ns	-2,45	-1,77	ns	-2,52	-1,31	ns	0,65	-1,15	ns	-3,49	ns
20 seg	-0,58	ns	-2,53	-1,35	ns	-1,73	-1,31	ns	0,74	-0,87	ns	-1,15	ns
25 seg	-0,79	ns	-2,49	-1,75	ns	-1,89	-1,48	ns	0,89	1,89	ns	-2,25	ns
30 seg	-2,00	ns	-2,38	-2,08	ns	-2,32	-1,54	ns	0,92	2,25	ns	-4,71	ns
45 seg	-3,33	ns	-2,99	-2,27	ns	-2,81	-1,61	ns	0,70	1,65	ns	-3,18	ns
1 min	-2,47	ns	-2,39	-1,48	ns	-2,85	-1,67	ns	-0,38	2,24	ns	-4,39	ns
1,5 min	-4,72	ns	-2,06	-0,59	ns	-2,26	-1,28	ns	-0,10	2,44	ns	-3,16	ns
2 min	-4,11	ns	-1,58	-0,37	ns	-2,19	-0,83	ns	0,22	2,27	ns	-2,70	ns
2,5 min	-3,62	ns	-1,22	-0,43	ns	-2,30	-0,39	ns	0,17	2,51	ns	-1,64	ns
3 min	-3,64	ns	-0,81	-0,19	ns	-2,47	-0,27	ns	-0,11	2,71	ns	-2,63	ns
4 min	-4,02	ns	-0,06	0,83	ns	-2,21	0,36	ns	1,08	2,62	ns	-2,49	ns
5 min	-3,64	ns	-0,10	1,11	ns	-1,88	0,74	ns	1,04	2,66	ns	-3,00	ns

FC NA 1µg										
	Controle	6 horas								
			Livre		Lipo					
		p<0,05?	0.10	0.30	p<0,05?	0.10	0.30	p<0,05?	1.00	p<0,05?
5 seg	0,17	ns	-1,70	-0,82	ns	-1,70	-0,37	ns	-0,37	ns
10 seg	0,07	ns	-2,83	0,11	ns	-2,83	-0,14	ns	-0,14	ns
15 seg	0,55	ns	-3,14	-0,59	ns	-3,14	-0,38	ns	-0,38	ns
20 seg	-0,15	ns	-2,60	-0,32	ns	-2,60	0,84	ns	0,84	ns
25 seg	-0,33	ns	-3,39	0,07	ns	-3,39	1,07	ns	1,07	ns
30 seg	-0,57	ns	-2,47	0,67	ns	-2,47	1,34	ns	1,34	ns
45 seg	-0,88	ns	-3,06	-1,66	ns	-3,06	1,21	ns	1,21	ns
1 min	-1,43	ns	-2,66	-0,46	ns	-2,66	2,09	ns	2,09	ns
1,5 min	-0,87	ns	-1,86	-0,41	ns	-1,86	2,16	ns	2,16	ns
2 min	-0,34	ns	-2,05	-0,45	ns	-2,05	2,61	ns	2,61	ns
2,5 min	-1,33	ns	-1,50	0,07	ns	-1,50	2,70	ns	2,70	ns
3 min	-0,15	ns	-1,20	0,14	ns	-1,20	2,72	ns	2,72	ns
4 min	0,45	ns	-0,63	0,53	ns	-0,63	2,52	ns	2,52	ns
5 min	-0,15	ns	-0,68	0,17	ns	-0,68	1,71	ns	1,71	ns

FC NA 1µg										
	Controle	4 horas								
			Livre		Lipo					
		p<0,05?	0.10	0.30	p<0,05?	0.10	0.30	p<0,05?	1.00	p<0,05?
5 seg	0,17	ns	0,44	0,44	ns	0,44	-0,71	ns	-0,71	ns
10 seg	0,07	ns	0,53	0,53	ns	-0,77	-0,77	ns	-0,77	ns
15 seg	0,55	ns	0,09	0,09	ns	0,06	0,06	ns	0,06	ns
20 seg	-0,15	ns	0,78	0,78	ns	0,34	0,34	ns	0,34	ns
25 seg	-0,33	ns	1,08	1,08	ns	-0,31	-0,31	ns	-0,31	ns
30 seg	-0,57	ns	-0,31	-0,31	ns	-0,88	-0,88	ns	-0,88	ns
45 seg	-0,88	ns	-1,09	-1,09	ns	-1,75	-1,75	ns	-1,75	ns
1 min	-1,43	ns	-0,95	-0,95	ns	-2,09	-2,09	ns	-2,09	ns
1,5 min	-0,87	ns	-0,44	-0,44	ns	-2,53	-2,53	ns	-2,53	ns
2 min	-0,34	ns	-0,11	-0,11	ns	-2,98	-2,98	ns	-2,98	ns
2,5 min	-1,33	ns	0,52	0,52	ns	-2,63	-2,63	ns	-2,63	ns
3 min	-0,15	ns	0,00	0,00	ns	-3,26	-3,26	ns	-3,26	ns
4 min	0,45	ns	0,85	0,85	ns	-2,45	-2,45	ns	-2,45	ns
5 min	-0,15	ns	0,81	0,81	ns	-3,02	-3,02	ns	-3,02	ns

Tabela 21: Variações percentuais do índice QTc após administração IV de NA 1µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piritostigmina livre e lipossomal.

Tempo	Controle	QTc NA 1µg											
		1 hora			2 horas								
		Livre	Lipo	p<0,05?	Livre	Lipo	p<0,05?						
5 seg	8,52	0,42	0,30	0,10	3,28	1,71	0,30	0,10	1,55	0,27	0,10	1,20	ns
10 seg	16,96	5,15	3,02	7,75	5,36	1,71	0,30	0,10	4,44	1,24	0,30	4,79	ns
15 seg	19,67	8,21	6,07	12,49	8,59	5,36	0,30	0,10	8,60	1,24	0,30	7,09	***
20 seg	20,19	8,76	6,03	15,69	11,92	8,59	0,30	0,10	10,61	4,33	0,30	8,01	***
25 seg	16,32	8,43	5,12	17,31	14,15	11,92	0,30	0,10	10,32	4,11	0,30	7,21	ns
30 seg	12,39	7,74	5,09	14,67	14,64	14,64	0,30	0,10	8,42	7,33	0,30	6,13	ns
45 seg	7,43	7,09	3,77	11,38	9,95	9,95	0,30	0,10	7,21	6,88	0,30	5,18	ns
1 min	4,69	6,13	4,07	9,70	7,04	7,04	0,30	0,10	5,72	5,82	0,30	3,49	ns
1,5 min	2,61	5,15	3,70	7,81	4,97	4,97	0,30	0,10	3,27	5,34	0,30	4,55	ns
2 min	2,18	3,87	1,26	5,26	2,46	2,46	0,30	0,10	2,47	5,77	0,30	2,37	ns
2,5 min	1,12	2,08	0,22	3,25	1,21	1,21	0,30	0,10	1,36	3,26	0,30	1,25	ns
3 min	0,13	1,30	0,54	2,07	1,08	1,08	0,30	0,10	1,18	4,02	0,30	0,48	ns
4 min	0,47	0,79	0,69	1,33	0,79	0,79	0,30	0,10	1,68	3,04	0,30	-0,32	ns
5 min	1,37	0,35	1,11	1,41	0,88	0,88	0,30	0,10	1,89	2,35	0,30	-1,07	ns

Tempo	Controle	QTc NA 1µg											
		4 horas			6 horas								
		Livre	Lipo	p<0,05?	Livre	Lipo	p<0,05?						
5 seg	8,52	0,42	0,30	0,10	3,28	1,71	0,30	0,10	1,55	0,27	0,10	1,20	ns
10 seg	16,96	5,15	3,02	7,75	5,36	1,71	0,30	0,10	4,44	1,24	0,30	4,79	ns
15 seg	19,67	8,21	6,07	12,49	8,59	5,36	0,30	0,10	8,60	1,24	0,30	7,09	***
20 seg	20,19	8,76	6,03	15,69	11,92	8,59	0,30	0,10	10,61	4,33	0,30	8,01	***
25 seg	16,32	8,43	5,12	17,31	14,15	11,92	0,30	0,10	10,32	4,11	0,30	7,21	ns
30 seg	12,39	7,74	5,09	14,67	14,64	14,64	0,30	0,10	8,42	7,33	0,30	6,13	ns
45 seg	7,43	7,09	3,77	11,38	9,95	9,95	0,30	0,10	7,21	6,88	0,30	5,18	ns
1 min	4,69	6,13	4,07	9,70	7,04	7,04	0,30	0,10	5,72	5,82	0,30	3,49	ns
1,5 min	2,61	5,15	3,70	7,81	4,97	4,97	0,30	0,10	3,27	5,34	0,30	4,55	ns
2 min	2,18	3,87	1,26	5,26	2,46	2,46	0,30	0,10	2,47	5,77	0,30	2,37	ns
2,5 min	1,12	2,08	0,22	3,25	1,21	1,21	0,30	0,10	1,36	3,26	0,30	1,25	ns
3 min	0,13	1,30	0,54	2,07	1,08	1,08	0,30	0,10	1,18	4,02	0,30	0,48	ns
4 min	0,47	0,79	0,69	1,33	0,79	0,79	0,30	0,10	1,68	3,04	0,30	-0,32	ns
5 min	1,37	0,35	1,11	1,41	0,88	0,88	0,30	0,10	1,89	2,35	0,30	-1,07	ns

Tabela 22: Variações percentuais do intervalo QT do ECG após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	QT NA 3µg														
	Controle	1 hora						2 horas							
		Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo			
	Média	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?
5 seg	3,89	2,70	ns	2,21	ns	0,94	ns	3,26	ns	2,31	ns	4,73	ns	1,67	ns
10 seg	10,92	7,92	ns	5,86	ns	7,08	ns	9,35	ns	7,90	ns	10,06	ns	5,28	ns
15 seg	18,71	13,90	***	8,98	***	11,22	*	14,63	ns	11,78	ns	19,01	ns	8,94	***
20 seg	22,32	15,40	***	10,19	***	15,50	ns	16,36	ns	14,93	*	17,08	ns	9,74	***
25 seg	22,19	13,86	***	9,59	***	15,08	*	15,67	ns	15,09	**	15,87	ns	9,19	***
30 seg	19,45	10,69	***	8,62	***	12,10	*	13,70	ns	14,26	ns	12,84	ns	8,46	***
45 seg	16,57	8,33	***	7,67	***	11,26	ns	10,37	ns	11,95	ns	10,56	ns	6,53	***
1 min	13,59	5,97	*	6,20	*	7,44	ns	7,68	ns	10,54	ns	8,76	ns	6,18	*
1,5 min	13,16	4,35	*	6,14	*	5,32	ns	6,68	ns	8,70	ns	8,23	ns	4,90	**
2 min	9,09	3,38	ns	4,57	ns	3,73	ns	3,61	ns	6,51	ns	5,98	ns	3,93	ns
2,5 min	7,66	1,27	ns	2,56	ns	1,87	ns	1,78	ns	3,75	ns	2,72	ns	3,63	ns
3 min	6,58	-0,03	ns	1,44	ns	0,73	ns	1,70	ns	3,07	ns	2,15	ns	1,74	ns
4 min	4,57	-0,16	ns	0,76	ns	0,47	ns	1,09	ns	0,79	ns	2,12	ns	1,56	ns
5 min	2,93	0,65	ns	0,25	ns	0,59	ns	1,18	ns	0,74	ns	1,49	ns	0,36	ns

QT NA 3µg											
4 horas						6 horas					
Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo	
0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?
2,27	ns	2,44	ns	8,13	ns	2,27	ns	2,44	ns	1,76	ns
8,13	ns	7,59	ns	13,52	ns	8,13	ns	7,59	ns	5,91	*
17,91	ns	14,82	ns	17,91	ns	17,91	ns	14,82	ns	13,67	**
19,61	ns	17,78	ns	19,61	ns	19,61	ns	17,78	ns	16,04	*
15,29	ns	12,77	ns	15,29	ns	15,29	ns	12,77	ns	14,96	ns
12,66	ns	9,06	ns	12,66	ns	12,66	ns	9,06	ns	12,66	ns
9,54	ns	5,82	ns	9,54	ns	9,54	ns	5,82	ns	9,34	ns
8,06	ns	3,13	ns	8,06	ns	8,06	ns	3,13	ns	6,08	ns
5,48	ns	1,32	ns	5,48	ns	5,48	ns	1,32	ns	3,72	ns
2,72	ns	0,86	ns	2,72	ns	2,72	ns	0,86	ns	1,09	ns
1,33	ns	1,03	ns	1,33	ns	1,33	ns	1,03	ns	-0,09	ns

QT NA 3µg											
4 horas						6 horas					
Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo	
0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?
3,05	ns	2,91	ns	1,71	ns	3,05	ns	2,91	ns	1,71	ns
9,02	ns	7,97	ns	5,00	ns	9,02	ns	7,97	ns	5,00	ns
14,49	ns	11,76	ns	8,83	***	14,49	ns	11,76	ns	8,83	***
17,46	ns	16,67	ns	10,67	***	17,46	ns	16,67	ns	10,67	***
17,47	ns	15,39	ns	11,64	***	17,47	ns	15,39	ns	11,64	***
15,16	ns	14,24	ns	9,85	***	15,16	ns	14,24	ns	9,85	***
12,10	ns	11,62	ns	7,13	**	12,10	ns	11,62	ns	7,13	**
9,94	ns	7,70	ns	4,73	**	9,94	ns	7,70	ns	4,73	**
8,27	ns	6,20	ns	3,02	**	8,27	ns	6,20	ns	3,02	**
5,13	ns	4,07	ns	2,52	ns	5,13	ns	4,07	ns	2,52	ns
3,29	ns	2,02	ns	1,66	ns	3,29	ns	2,02	ns	1,66	ns
2,69	ns	1,80	ns	0,99	ns	2,69	ns	1,80	ns	0,99	ns
1,79	ns	1,02	ns	0,60	ns	1,79	ns	1,02	ns	0,60	ns
1,78	ns	0,59	ns	0,38	ns	1,78	ns	0,59	ns	0,38	ns

Tabela 23: Variações percentuais do intervalo PR do ECG após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	PR NA 3µg												
	1 hora						2 horas						
	Livre			Lipo			Livre			Lipo			
Controle	Média	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?
5 seg	0.26	-0.04	ns	0.01	ns	0.41	ns	0.30	ns	0.82	ns	0.45	ns
10 seg	4.83	-0.10	ns	0.62	ns	1.14	ns	0.08	ns	0.61	ns	0.59	ns
15 seg	5.76	-0.12	***	0.08	**	1.02	*	0.02	**	0.47	**	-	***
20 seg	5.46	-0.08	***	-0.49	***	0.99	*	0.10	**	-0.13	*	0.43	***
25 seg	3.76	0.00	ns	0.00	ns	1.14	ns	0.11	ns	0.62	ns	0.85	ns
30 seg	3.98	-0.46	*	0.11	*	1.23	ns	-0.33	ns	-0.88	*	0.07	*
45 seg	4.07	0.28	ns	-0.03	ns	1.99	ns	0.29	ns	1.37	ns	0.72	ns
1 min	4.07	0.07	**	0.51	ns	2.16	ns	-0.05	ns	1.60	ns	0.76	ns
1,5 min	4.00	0.25	ns	0.17	ns	2.89	ns	0.58	ns	1.61	ns	0.74	ns
2 min	4.05	0.29	ns	1.06	ns	2.09	ns	0.54	ns	1.86	ns	0.61	ns
2,5 min	3.16	0.39	ns	0.17	ns	2.16	ns	0.29	ns	1.54	ns	0.83	ns
3min	2.12	-0.38	ns	0.45	ns	1.26	ns	-0.35	ns	0.58	ns	-	ns
4 min	0.18	-0.38	ns	-0.66	ns	0.22	ns	-0.15	ns	-0.19	ns	-	ns
5 min	0.65	-0.51	ns	0.30	ns	0.45	ns	-0.30	ns	-0.33	ns	-	ns

PR NA 3µg 6 horas											
Livre			Lipo			Livre			Lipo		
0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?
0.58	ns	0.35	ns	0.17	ns	0.67	ns	1.04	ns	0.01	ns
1.55	ns	1.04	*	0.51	*	1.06	ns	0.62	*	-0.06	**
1.06	ns	0.62	*	0.49	*	0.09	ns	0.49	ns	-0.33	**
0.57	ns	-	ns	0.30	ns	1.67	ns	-	ns	0.04	ns
1.67	ns	0.30	ns	0.46	ns	2.90	ns	0.46	ns	0.62	ns
2.20	ns	0.92	ns	0.92	ns	2.48	ns	0.92	ns	0.96	ns
2.48	ns	1.03	ns	1.03	ns	2.38	ns	1.03	ns	1.51	ns
2.38	ns	0.74	ns	0.74	ns	1.16	ns	0.74	ns	1.04	ns
1.16	ns	0.28	ns	0.28	ns	0.46	ns	0.28	ns	1.04	ns
0.46	ns	-	ns	-	ns	0.49	ns	-	ns	0.58	ns
0.49	ns	0.01	ns	0.01	ns	0.49	ns	0.01	ns	-0.08	ns
0.49	ns	0.01	ns	0.01	ns	0.49	ns	0.01	ns	-0.24	ns

PR NA 3µg 4 horas											
Livre			Lipo			Livre			Lipo		
0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?	0.10	p<0.05?	0.30	p<0.05?	1.00	p<0.05?
0.04	ns	0.15	ns	-0.28	ns	1.33	ns	0.13	*	-0.27	*
0.82	*	-0.48	***	-0.76	***	0.80	*	-0.01	**	-0.76	***
0.94	ns	0.49	ns	-0.52	ns	1.09	ns	-0.30	ns	-0.53	***
-0.36	ns	-0.30	ns	-0.22	ns	0.94	ns	0.49	ns	-0.52	ns
1.09	ns	0.29	ns	-0.09	ns	1.31	ns	-0.30	ns	-0.09	ns
1.31	ns	0.18	ns	-0.45	ns	1.66	ns	0.18	ns	-0.45	ns
1.66	ns	0.48	ns	-0.35	ns	1.94	ns	0.48	ns	-0.35	ns
1.94	ns	0.41	ns	-0.16	ns	0.82	ns	0.43	ns	-0.16	ns
0.82	ns	-0.32	ns	-0.35	ns	-0.03	ns	-0.32	ns	-0.35	ns
-0.03	ns	-0.49	ns	-0.37	ns	-0.09	ns	-0.49	ns	-0.37	ns
-0.09	ns	-0.54	ns	-0.52	ns	0.31	ns	-0.54	ns	-0.52	ns

Tabela 24: Variações percentuais do complexo QRS do ECG após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	Controle	QRS NA 3µg					
		1 hora			2 horas		
		0.10	p<0,05?	Livre	0.30	p<0,05?	Lipo
Média		0.10	p<0,05?	0.30	p<0,05?	1.00	p<0,05?
5 seg	0.01	-0.62	ns	-1.70	ns	0.17	ns
10 seg	3.14	-0.39	ns	-0.26	ns	1.08	ns
15 seg	4.90	0.65	ns	1.88	ns	1.12	ns
20 seg	6.08	0.20	***	1.48	ns	2.72	ns
25 seg	5.14	-0.08	ns	-0.28	*	1.42	ns
30 seg	5.28	-0.22	*	1.27	ns	2.23	ns
45 seg	2.00	-0.47	ns	1.47	ns	1.15	ns
1 min	1.91	-0.34	ns	-0.06	ns	1.42	ns
1,5 min	2.33	-0.57	ns	-0.17	ns	0.26	ns
2 min	2.20	-0.53	ns	-0.31	ns	-0.03	ns
2,5 min	1.07	-0.09	ns	-0.69	ns	-1.10	ns
3 min	0.98	0.12	ns	-0.59	ns	-0.76	ns
4 min	0.15	-0.47	ns	-0.09	ns	0.33	ns
5 min	0.58	-0.25	ns	0.03	ns	-0.33	ns

Tempo	Controle	QRS NA 3µg					
		1 hora			2 horas		
		0.10	p<0,05?	Livre	0.30	p<0,05?	Lipo
Média		0.10	p<0,05?	0.30	p<0,05?	1.00	p<0,05?
5 seg	0.01	-0.74	ns	-0.05	ns	-0.39	ns
10 seg	3.14	-0.04	ns	0.58	ns	1.49	ns
15 seg	4.90	-0.37	*	0.60	ns	2.23	ns
20 seg	6.08	0.79	*	0.41	*	1.64	ns
25 seg	5.14	-0.44	*	0.50	ns	1.15	ns
30 seg	5.28	-0.70	ns	0.83	ns	1.72	ns
45 seg	2.00	-1.16	ns	-0.23	ns	1.66	ns
1 min	1.91	-1.01	ns	0.54	ns	1.63	ns
1,5 min	2.33	-0.91	ns	0.20	ns	0.29	ns
2 min	2.20	-0.65	ns	-0.33	ns	0.07	ns
2,5 min	1.07	0.15	ns	0.33	ns	0.12	ns
3 min	0.98	-0.23	ns	-0.23	ns	0.23	ns
4 min	0.15	-0.21	ns	0.14	ns	-0.19	ns
5 min	0.58	-0.69	ns	-0.17	ns	0.11	ns

Tempo	Controle	QRS NA 3µg					
		4 horas			6 horas		
		0.10	p<0,05?	Livre	0.30	p<0,05?	Lipo
Média		0.10 <th>p<0,05?</th> <th>Livre</th> <th>0.30</th> <th>p<0,05?</th> <th>Lipo</th>	p<0,05?	Livre	0.30	p<0,05?	Lipo
5 seg	0.43	ns	-0.78	ns	-0.26	ns	-0.40
10 seg	1.31	ns	-0.15	ns	0.89	ns	0.31
15 seg	0.45	ns	0.48	ns	0.77	ns	-0.25
20 seg	2.46	ns	1.80	ns	2.18	ns	0.54
25 seg	1.99	ns	-0.30	ns	0.87	ns	0.19
30 seg	2.53	ns	0.27	ns	1.72	ns	0.27
45 seg	1.72	ns	-0.07	ns	0.54	ns	-1.15
1 min	0.53	ns	0.00	ns	0.37	ns	-0.39
1,5 min	1.36	ns	0.01	ns	0.60	ns	-0.34
2 min	-0.37	ns	-0.49	ns	-0.22	ns	-0.79
2,5 min	0.81	ns	0.17	ns	1.01	ns	0.00
3 min	-1.11	ns	0.25	ns	0.04	ns	-0.27
4 min	0.26	ns	-0.28	ns	0.16	ns	0.24
5 min	0.07	ns	-0.04	ns	0.08	ns	0.09

Tempo	Controle	QRS NA 3µg					
		4 horas			6 horas		
		0.10	p<0,05?	Livre	0.30	p<0,05?	Lipo
Média		0.10 <th>p<0,05?</th> <th>Livre</th> <th>0.30</th> <th>p<0,05?</th> <th>Lipo</th>	p<0,05?	Livre	0.30	p<0,05?	Lipo
5 seg	-1.03	ns	1.29	ns	-0.26	ns	-0.40
10 seg	1.29	ns	1.14	ns	0.89	ns	0.31
15 seg	1.19	ns	1.19	ns	0.77	ns	-0.25
20 seg	-0.08	ns	0.86	ns	2.18	ns	0.54
25 seg	-0.50	ns	0.86	ns	0.87	ns	0.19
30 seg	1.18	ns	0.54	ns	1.72	ns	0.27
45 seg	0.07	ns	1.18	ns	0.37	ns	-1.15
1 min	0.64	ns	0.07	ns	0.60	ns	-0.34
1,5 min	0.39	ns	0.64	ns	-0.22	ns	-0.79
2 min	0.11	ns	0.39	ns	1.01	ns	0.00
2,5 min	0.55	ns	0.11	ns	0.04	ns	-0.27
3 min	0.70	ns	0.55	ns	0.16	ns	0.24
4 min	0.70	ns	0.08	ns	0.08	ns	0.09

Tabela 25: Variações percentuais da pressão arterial sistólica após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	PAS NA 3µg													
	Controle	1 hora						2 horas						
		Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo		
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	1,00	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?
5 seg	16,91	ns	21,57	ns	23,37	ns	19,79	ns	17,90	ns	18,62	ns	15,15	ns
10 seg	68,29	ns	32,43	ns	37,90	ns	49,84	ns	33,38	ns	38,17	ns	29,74	ns
15 seg	73,02	ns	47,38	ns	54,15	ns	55,71	ns	35,92	ns	48,97	ns	40,95	ns
20 seg	69,27	ns	42,34	ns	51,57	ns	57,88	ns	29,82	ns	50,15	ns	42,47	ns
25 seg	64,88	ns	42,61	ns	50,05	ns	56,90	ns	27,79	ns	49,64	ns	39,04	ns
30 seg	56,31	ns	38,25	ns	47,17	ns	52,67	ns	25,11	ns	50,31	ns	37,91	ns
45 seg	37,42	ns	34,49	ns	43,44	ns	48,84	ns	20,87	ns	49,57	ns	32,56	ns
1 min	26,66	ns	26,42	ns	41,10	ns	45,80	ns	15,73	ns	46,92	ns	26,21	ns
1,5 min	13,45	ns	18,55	ns	33,83	ns	36,33	ns	10,18	ns	39,85	ns	16,38	ns
2 min	11,90	ns	10,47	ns	27,07	ns	29,88	ns	6,97	ns	34,44	ns	18,94	ns
2,5 min	12,65	ns	13,17	ns	25,36	ns	27,37	ns	5,30	ns	28,68	ns	14,68	ns
3 min	12,96	ns	11,68	ns	13,58	ns	16,17	ns	6,01	ns	20,87	ns	6,68	ns
4 min	4,79	ns	-1,00	ns	5,88	ns	9,94	ns	7,65	ns	4,94	ns	1,99	ns
5 min	1,46	ns	-2,55	ns	2,78	ns	4,10	ns	6,75	ns	1,32	ns	-1,23	ns

PAS NA 3µg														
Tempo	Controle	4 horas						6 horas						
		Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo		
		0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	
5 seg	26,40	ns	26,11	ns	23,81	ns	23,83	ns	17,39	ns	23,83	ns	11,26	ns
10 seg	39,41	ns	37,42	ns	50,92	ns	32,88	ns	38,60	ns	32,88	ns	45,08	ns
15 seg	53,50	ns	52,14	ns	75,16	ns	38,99	ns	59,47	ns	38,99	ns	68,01	ns
20 seg	54,93	ns	45,11	ns	75,63	ns	32,22	ns	63,71	ns	32,22	ns	72,53	ns
25 seg	52,49	ns	43,56	ns	73,00	ns	31,81	ns	61,13	ns	31,81	ns	70,53	ns
30 seg	47,87	ns	38,38	ns	67,09	ns	28,79	ns	56,60	ns	28,79	ns	66,17	ns
45 seg	42,41	ns	37,15	ns	59,15	ns	26,50	ns	47,98	ns	26,50	ns	55,42	ns
1 min	34,33	ns	30,03	ns	47,41	ns	22,36	ns	41,66	ns	22,36	ns	48,09	ns
1,5 min	23,54	ns	22,51	ns	30,90	ns	17,05	ns	32,87	ns	17,05	ns	34,99	ns
2 min	16,20	ns	14,83	ns	21,88	ns	13,61	ns	24,96	ns	13,61	ns	25,51	ns
2,5 min	17,74	ns	14,44	ns	29,62	ns	11,53	ns	20,42	ns	11,53	ns	16,51	ns
3 min	8,00	ns	13,87	ns	8,39	ns	10,52	ns	8,89	ns	10,52	ns	8,95	ns
4 min	6,49	ns	3,11	ns	1,59	ns	4,93	ns	1,77	ns	4,93	ns	0,12	ns
5 min	3,39	ns	-1,07	ns	2,38	ns	2,22	ns	-1,03	ns	2,22	ns	-3,67	ns

Tabela 26: Variações percentuais da pressão arterial diastólica após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	PAD NA 3µg												
	1 hora						2 horas						
	Controle		Livre		Lipo		Controle		Livre		Lipo		
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	
5 seg	18,28	16,80	ns	31,44	ns	23,15	ns	14,15	ns	13,45	ns	11,00	ns
10 seg	70,34	57,86	ns	44,80	ns	48,17	ns	69,12	ns	50,36	ns	28,87	ns
15 seg	68,84	72,29	ns	61,81	ns	70,04	ns	81,33	ns	60,83	ns	43,24	ns
20 seg	63,16	67,18	ns	52,58	ns	66,68	ns	77,39	ns	62,71	ns	45,11	ns
25 seg	56,25	62,70	ns	52,35	ns	66,95	ns	76,46	ns	61,72	ns	47,59	ns
30 seg	54,80	58,44	ns	46,32	ns	62,48	ns	72,86	ns	60,91	ns	49,62	ns
45 seg	41,78	54,38	ns	40,02	ns	56,02	ns	65,81	ns	52,85	ns	33,68	ns
1 min	29,98	53,10	ns	32,67	ns	53,76	ns	59,88	ns	47,99	ns	31,02	ns
1,5 min	18,07	42,64	ns	22,40	ns	42,63	ns	41,19	ns	38,41	ns	19,91	ns
2 min	10,45	35,71	ns	17,08	ns	36,73	ns	32,05	ns	31,31	ns	9,88	ns
2,5 min	11,03	21,13	ns	15,58	ns	28,31	ns	21,68	ns	22,70	ns	8,37	ns
3 min	12,41	15,74	ns	13,71	ns	13,58	ns	11,29	ns	13,38	ns	2,66	ns
4 min	2,93	5,63	ns	2,62	ns	5,04	ns	3,92	ns	5,45	ns	2,97	ns
5 min	0,18	6,19	ns	-1,51	ns	1,93	ns	1,68	ns	1,81	ns	-3,84	ns

PAD NA 3µg												
6 horas						Lipo						
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?
5 seg	13,58	ns	32,12	ns	41,03	ns	32,12	ns	42,77	ns	8,68	ns
10 seg	68,27	ns	46,73	ns	68,27	ns	46,73	ns	81,56	ns	53,15	ns
15 seg	70,12	ns	36,58	ns	70,12	ns	36,58	ns	83,76	ns	81,56	ns
20 seg	67,52	ns	34,46	ns	67,52	ns	34,46	ns	77,66	ns	83,76	ns
25 seg	66,27	ns	30,19	ns	66,27	ns	30,19	ns	75,76	ns	77,66	ns
30 seg	55,34	ns	26,82	ns	55,34	ns	26,82	ns	70,58	ns	70,58	ns
45 seg	48,89	ns	22,85	ns	48,89	ns	22,85	ns	62,03	ns	62,03	ns
1 min	38,68	ns	16,64	ns	38,68	ns	16,64	ns	45,00	ns	45,00	ns
1,5 min	28,90	ns	13,06	ns	28,90	ns	13,06	ns	31,04	ns	31,04	ns
2 min	18,79	ns	11,65	ns	18,79	ns	11,65	ns	17,35	ns	17,35	ns
2,5 min	8,35	ns	10,70	ns	8,35	ns	10,70	ns	7,06	ns	7,06	ns
3 min	0,70	ns	0,95	ns	0,70	ns	0,95	ns	-3,14	ns	-3,14	ns
4 min	-1,21	ns	1,57	ns	-1,21	ns	1,57	ns	-4,14	ns	-4,14	ns

PAD NA 3µg												
4 horas						Lipo						
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?
5 seg	18,90	ns	34,33	ns	25,24	ns	34,33	ns	25,24	ns	25,24	ns
10 seg	38,67	ns	45,94	ns	61,23	ns	45,94	ns	61,23	ns	61,23	ns
15 seg	54,65	ns	63,12	ns	86,55	ns	63,12	ns	86,55	ns	86,55	ns
20 seg	52,75	ns	53,49	ns	80,42	ns	53,49	ns	80,42	ns	80,42	ns
25 seg	47,61	ns	51,71	ns	79,39	ns	51,71	ns	79,39	ns	79,39	ns
30 seg	43,53	ns	45,82	ns	75,21	ns	45,82	ns	75,21	ns	75,21	ns
45 seg	34,63	ns	43,38	ns	64,13	ns	43,38	ns	64,13	ns	64,13	ns
1 min	29,46	ns	38,41	ns	52,63	ns	38,41	ns	52,63	ns	52,63	ns
1,5 min	17,01	ns	28,12	ns	31,22	ns	28,12	ns	31,22	ns	31,22	ns
2 min	14,03	ns	19,90	ns	21,63	ns	19,90	ns	21,63	ns	21,63	ns
2,5 min	10,03	ns	20,27	ns	12,88	ns	20,27	ns	12,88	ns	12,88	ns
3 min	2,29	ns	19,92	ns	5,48	ns	19,92	ns	5,48	ns	5,48	ns
4 min	3,43	ns	6,49	ns	1,34	ns	6,49	ns	1,34	ns	1,34	ns
5 min	-1,00	ns	-0,86	ns	1,57	ns	-0,86	ns	1,57	ns	1,57	ns

Tabela 28: Variações percentuais do índice QTc após administração IV de NA 3µg nos diferentes tempos experimentais após o tratamento com diferentes doses de Piridostigmina livre e lipossomal.

Tempo	QTc NA 3µg														
	1 hora					2 horas									
	Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo				
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	1,00	p<0,05?	
5 seg	0,81	2,74	ns	3,01	ns	0,53	ns	2,86	ns	1,44	ns	4,59	ns	1,56	ns
10 seg	5,92	7,51	ns	5,76	ns	5,34	ns	7,14	ns	6,63	ns	10,11	ns	3,81	ns
15 seg	11,69	12,82	ns	6,04	ns	8,24	ns	10,51	ns	9,04	ns	18,58	ns	8,98	ns
20 seg	14,00	13,65	ns	6,64	ns	12,86	ns	12,39	ns	10,29	ns	16,00	ns	10,57	ns
25 seg	16,42	12,81	ns	5,90	ns	12,54	ns	11,53	ns	10,45	ns	15,10	ns	10,38	ns
30 seg	15,28	10,07	ns	4,57	*	11,01	ns	10,88	ns	9,74	ns	11,60	ns	9,05	ns
45 seg	11,89	7,89	ns	4,20	ns	10,36	ns	8,82	ns	8,14	ns	9,21	ns	6,64	ns
1 min	10,63	5,36	ns	4,03	ns	6,88	ns	6,49	ns	7,93	ns	7,83	ns	4,71	ns
1,5 min	11,62	3,73	ns	4,61	ns	4,85	ns	5,18	ns	6,14	ns	6,99	ns	4,45	ns
2 min	7,69	2,76	ns	3,24	ns	3,35	ns	2,59	ns	4,36	ns	5,52	ns	3,82	ns
2,5 min	6,57	0,93	ns	1,66	ns	1,69	ns	1,60	ns	2,57	ns	0,83	ns	1,81	ns
3 min	5,03	-0,07	ns	0,03	ns	0,80	ns	1,58	ns	2,60	ns	2,16	ns	0,73	ns
4 min	3,92	0,12	ns	-0,58	ns	0,69	ns	1,01	ns	0,82	ns	2,57	ns	0,05	ns
5 min	2,32	-0,22	ns	-0,70	ns	0,63	ns	1,10	ns	0,71	ns	-0,66	ns	-0,37	ns

QTc NA 3µg												
4 horas					6 horas							
Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo		
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?
5 seg	1,92	ns	3,25	ns	1,37	ns	2,46	ns	1,56	ns	2,46	ns
10 seg	7,64	ns	6,27	ns	4,80	ns	6,13	ns	5,01	ns	6,13	ns
15 seg	11,55	ns	8,81	ns	5,77	ns	9,33	ns	7,75	ns	9,33	ns
20 seg	13,90	ns	13,85	ns	7,01	ns	11,68	ns	8,03	ns	11,68	ns
25 seg	14,15	ns	12,84	ns	8,58	ns	14,10	ns	8,42	ns	14,10	ns
30 seg	11,87	ns	12,70	ns	7,49	ns	12,19	ns	7,72	ns	12,19	ns
45 seg	9,45	ns	10,04	ns	5,85	ns	8,99	ns	11,15	ns	8,99	ns
1 min	8,01	ns	5,79	ns	3,74	ns	6,30	ns	8,35	ns	6,30	ns
1,5 min	6,58	ns	4,80	ns	2,23	ns	4,40	ns	5,38	ns	4,40	ns
2 min	3,51	ns	3,12	ns	1,72	ns	2,21	ns	3,32	ns	2,21	ns
2,5 min	1,80	ns	1,57	ns	1,13	ns	0,69	ns	0,99	ns	0,69	ns
3 min	2,12	ns	1,45	ns	0,57	ns	1,37	ns	1,03	ns	1,37	ns
4 min	1,68	ns	0,33	ns	0,02	ns	0,68	ns	0,57	ns	0,68	ns
5 min	1,47	ns	0,11	ns	-0,28	ns	0,76	ns	0,62	ns	0,76	ns

QTc NA 3µg												
4 horas					6 horas							
Livre		Lipo		Livre		Lipo		Livre		Lipo		
	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?	0,10	p<0,05?	0,30	p<0,05?
5 seg	1,94	ns	2,46	ns	1,56	ns	2,46	ns	1,56	ns	2,46	ns
10 seg	6,95	ns	6,13	ns	5,01	ns	6,13	ns	5,01	ns	6,13	ns
15 seg	9,52	ns	9,33	ns	7,75	ns	9,33	ns	7,75	ns	9,33	ns
20 seg	12,69	ns	11,68	ns	8,03	ns	11,68	ns	8,03	ns	11,68	ns
25 seg	12,96	ns	14,10	ns	8,42	ns	14,10	ns	8,42	ns	14,10	ns
30 seg	13,68	ns	12,19	ns	7,72	ns	12,19	ns	7,72	ns	12,19	ns
45 seg	10,87	ns	8,99	ns	11,15	ns	8,99	ns	11,15	ns	8,99	ns
1 min	9,36	ns	6,30	ns	8,35	ns	6,30	ns	8,35	ns	6,30	ns
1,5 min	8,03	ns	4,40	ns	5,38	ns	4,40	ns	5,38	ns	4,40	ns
2 min	6,94	ns	2,21	ns	3,32	ns	2,21	ns	3,32	ns	2,21	ns
2,5 min	4,62	ns	0,69	ns	0,99	ns	0,69	ns	0,99	ns	0,69	ns
3 min	4,48	ns	1,37	ns	1,03	ns	1,37	ns	1,03	ns	1,37	ns
4 min	2,67	ns	0,68	ns	0,57	ns	0,68	ns	0,57	ns	0,68	ns
5 min	1,60	ns	0,76	ns	0,62	ns	0,76	ns	0,62	ns	0,76	ns

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](#)